

**BAHAN AJAR**  
**KULTUR JARINGAN**



**Disusun oleh**  
**Dr. MARINA SILALAH, M.Si**

**PRODI PENDIDIKAN BIOLOGI**  
**FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN**  
**UNIVERSITAS KRISTEN INDONESIA**  
**GASAL 2014/2015**

## **KATA PENGANTAR**

Bahan Ajar Kultur Jaringan ini disiapkan untuk membantu mahasiswa memahami kultur jaringan tanaman dan hewan mulai dari peralatan, media, dan teknik atau proses pelaksanaannya. Pengenalan Kultur Jaringan merupakan salah satu langkah sederhana untuk memperkenalkan bioteknologi yang dapat diaplikasikan untuk meningkatkan kesejahteraan manusia dan juga untuk tujuan konservasi tumbuhan maupun hewan.

Bahan Ajar ini terdiri dari 9 bab yang membahas kultur jaringan hewan dan tumbuhan. Kultur jaringan memiliki bahasan yang sangat luas sehingga bahan ajar ini hanya memuat kultur jaringan yang banyak digunakan dalam penelitian yang dilengkapi dengan contoh-contoh pelaksanaannya.

Bahan Ajar ini masih banyak kekurangan baik dari segi isi maupun teknis penulisan. Penulis mengharapkan masukan dari berbagai pihak untuk penyempurnaan Bahan Ajar ini. Semoga Bahan Ajar ini membawa kemajuan bagi mahasiswa UKI, khususnya prodi Biologi FKIP UKI.

Salam

Penulis

## DAFTAR ISI

	Hal
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	ii
SILABUS.....	iii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II FASILITAS DAN TEKNIK UNTUK KULTUR JARINGAN TANAMAN.....	7
BAB III MEDIA KULTUR JARINGAN.....	17
BAB IV TAHAPAN DALAM KULTUR JARINGAN.....	31
BAB V JENIS JENIS KULTUR JARINGAN.....	38
BAB VI MIKROPROPAGASI.....	52
BAB VII FUSI PROTOPLAS.....	61
BAB VIII PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER TUMBUHAN MELALUI KULTUR <i>IN VITRO</i> .....	75
BAB IX BIOTEKNOLOGI SEL HEWAN.....	86
DAFTAR PUSTAKA.....	94

## SILABUS

**MATA KULIAH : KULTUR JARINGAN**  
**SKS : 3 SKS**  
**DOSEN : MARINA SILALAH**

### Deskripsi Mata Kuliah

Mata kuliah ini mengembangkan pemahaman, keterampilan, dan kemampuan bernalar mahasiswa melalui penjelasan, diskusi, presentasi, observasi, interpretasi, praktikum, tugas-tugas membaca, merangkum, dan membuat laporan praktikum dari Kultur Jaringan Tumbuhan maupun Hewan.

### Kompetensi yang ingin dicapai

Setelah mengikuti perkuliahan Kultur Jaringan, mahasiswa Program Studi Pendidikan Biologi diharapkan mempunyai gambaran, pemahaman, keterampilan, dan kemampuan bernalar tentang kultur jaringan tumbuhan maupun hewan sehingga dapat memanfaatkannya dalam penelitian maupun meningkatkan kesejahteraan manusia dan untuk konservasi tumbuhan maupun hewan.

### Strategi Perkuliahan

Pendekatan : Ekspositori dan keterampilan proses

Metode : Ceramah, diskusi, penugasan, tanya jawab, dan praktikum.

Tugas : Merangsang laboratorium kultur jaringan, laporan praktikum, buku gambar, laporan individu

Media : LCD

No	Indikator/Capaian Pembelajaran	Materi	Sumber	Pertemuan
1	Mahasiswa memahami tata tertib perkuliahan serta bahan materi perkuliahan Kultur Jaringan	KONTRAK PERKULIAHAN	Silabus	1
2	Mahasiswa mampu 1. Menjelaskan prinsip dasar dari kultur jaringan. 2. Menjelaskan peranan ilmu pengetahuan dalam pengembangan kultur jaringan.	BAB I PENDAHULUAN	1,3,11	2



	3. Menjelaskan penanan kultur jaringan pada kehidupan manusia.			
3	Mahasiswa mampu 1. Mendesain laboratorium kultur jaringan. 2. Menjelaskan fasilitas dan alat dalam laboratorium kultur jaringan beserta fungsinya. 3. Menjelaskan fasilitas alternatif untuk pengembangan kultur jaringan jika fasilitas yang diperlukan tidak terpenuhi.	BAB II FASILITAS DAN TEKNIK UNTUK KULTUR JARINGAN TANAMAN	1, 3,4	3
4	Mahasiswa mampu 1. Menjelaskan jenis-jenis media yang digunakan dalam kultur jaringan. 2. Menjelaskan komponen makro dan mikronutrien yang terdapat pada berbagai jenis media.	BAB III MEDIA KULTUR JARINGAN	1,3,4	4,5
5	Mahasiswa mampu 1. Menjelaskan tahapan yang dilakukan dalam pengerjaan kultur jaringan. 2. Mengidentifikasi titik kritis untuk keberhasilan kultur jaringan.	BAB IV TAHAPAN DALAM KULTUR JARINGAN	1,7,8,10,11	6
6	Mahasiswa mampu 1. Menjelaskan perbedaan proses pelaksanaan kultur kalus, sel dan organ. 2. Menjelaskan perbedaan embriogenesis somatis secara langsung dan tidak langsung. 3. Merancang percobaan untuk pembuatan kultur kalus.	BAB V JENIS JENIS KULTUR JARINGAN	1,7,8,10,11,12	7
<b>Ujian Tengah Semester</b>				
7	Mahasiswa mampu	BAB VI MIKROPROPAGASI	1,7,10,11	8,9

	1. Menjelaskan cara perbanyak tumbuhan melalui mikropagasi. 2. Menjelaskan keuntungan perbanyak tumbuhan melalui mikropagasi.			
9	Mahasiswa mampu 1. Menjelaskan proses fusi protoplast 2. Menjelaskan fungsi enzim-enzim dalam fusi protoplast 3. Menjelaskan aplikasi fusi protoplas dalam kehidupan manusia	BAB VII FUSI PROTOPLAS	1,2,6	10,11
10	Mahasiswa mampu 1. Menjelaskan proses produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan. 2. Menjelaskan keuntungan produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan.	BAB VIII PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER TUMBUHAN MELALUI KULTUR <i>IN VITRO</i>	1,3,9,11,12	12
11	Mahasiswa mampu 1. Menjelaskan proses kultur jaringan hewan 2. Mahasiswa dapat menjelaskan aplikasi kultur jaringan hewan pada manusia	BAB IX BIOTEKNOLOGI SEL HEWAN	1,8	13,14
<b>Ujian Akhir Semester</b>				

#### Referensi:

1. Hussain, A., I.A. Qarshi, H. Nazir and I. Ullah. 2010. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. <http://dx.doi.org/10.5772/50568>.: 1-28.
2. Mariska, I. dan Husni, A. 2006 Perbaikan Sifat Genotipe Melalui Fusi Protoplas Pada Tanaman Lada, Nilam, Dan Terung. *Jurnal Litbang Pertanian*, 25(2): 55-60.

3. Mantell SH, and H Smith. 1983. Culture Factor That Influence Secondary Metabolite Accumulation in Plant Cell and Tissue. In: *Plant Biotechnology*. Mantell SH and H Smith (Eds). 75-108. Cambridge University Press. New York.
4. Mineo, L. 1990. Plant tissue culture techniques. Pages 151-174, in *Tested studies for laboratory teaching*. Volume 11. (C. A. Goldman, Editor). Proceedings of the Eleventh Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 195 pages.
5. Puspitasari, R.L., T. Caroline, Sardjono, B. Setiawan, F.Sandra. 2008. Kultur Embrionic Stem Cell menjadi Sel Neuron dengan Medium Bebas Serum. *CDK* 165.35 (6): 342-344.
6. Riyadi, I. 2006. Isolasi Protoplas Tanaman Kacang Panjang secara Enzimatis. *Buletin Plasma Nutfah* 12(2): 62-68.
7. Seswita, D. 2010. Penggunaan Air Kelapa Sebagai Zat Pengatur Tumbuh Pada Multiplikasi Tunas Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) secara *In Vitro*. *Jurnal Littri* 16(4):135-140.
8. Silalahi, M. 2010. Pengaruh Modifikasi Media Murashige-Skoog (MS) dan Zat Pengatur Tumbuh BAP terhadap Pertumbuhan Kalus *Centella asiatica* L.(Urban.) Pengaruh Modifikasi Media Murashige-Skoog (MS) dan Zat Pengatur Tumbuh BAP terhadap Pertumbuhan Kalus *Centella asiatica* L.(Urban.). *Prolife* 2(1):11-17.
9. Silalahi, M., 2010. Elisitasi Peningkatan Produksi Ajmalisin oleh Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Berita Biologi* 10(3):305-312.
10. Singh, H.P., S. U.R. Selvarajan, and J.L. Karihaloo. 2011. *Micropropagation For Production of Quality Banana Planting Material In Asia-Pacific*. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB) Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions (APAARI) NASC Complex, Dev Prakash Shastri Marg, Pusa Campus New Delhi, India
11. Yelnitis dan T.E. Komar. 2010. *Technical Report Upaya Induksi Kalus Embriogenik Dari Potongan Daun Ramin*. Pusat Penelitian Dan Pengembangan Hutan Dan Konservasi Alam Kementerian Kehutanan Bogor: 1-28.

12. Zakiah, Z. E. Marwani, dan A. H. Siregar. 2006. Peningkatan Produksi Azadirachtin dalam Kultur Suspensi Sel *Azadirachta indica* A.Juss melalui Penambahan Skualen. *Jurnal Matematika dan Sains* 8 (4):141-146.

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **Capaian Pembelajaran:**

4. Mahasiswa dapat menjelaskan prinsip dasar dari kultur jaringan.
5. Mahasiswa dapat menjelaskan peranan ilmu pengetahuan dalam pengembangan kultur jaringan.
6. Mahasiswa dapat menjelaskan peranan kultur jaringan pada kehidupan manusia.

#### **A. Pendahuluan**

Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan sel, jaringan atau organ tanaman dengan pada medium buatan (*in vitro*) secara aseptik. Sejarah perkembangan kultur jaringan, urutannya mungkin saja berbeda pada setiap buku tergantung sumber literatur yang digunakan. Teknologi kultur *in vitro* dimulai dengan spekulasi ilmuwan dari Jerman bernama Haberlandt pada awal abad ke 20 tentang teori totipotensi. Haberlandt menyatakan bahwa setiap sel mampu tumbuh dan berkembang menjadi tanaman normal jika dikulturkan pada nutrisi dan lingkungan yang tepat.

Berikut ini merupakan gambaran umum sejarah perkembangan kultur jaringan:

- ✓ 1838, ditemukannya teori totipotensi oleh Schwann dan Schleiden.
- ✓ 1880, Julius von Sachs menemukan bahwa di dalam tanaman terdapat senyawa yang berfungsi untuk membentuk organ-organ.
- ✓ 1902, Haberlandt mulai melakukan praktek kultur jaringan tanaman dengan mengkultur kultur sel-sel tanaman pada larutan hara untuk hidroponik + sukrosa + asparagin dan mengamati ukuran sel meningkat namun tidak dapat membelah. Sel tanaman tersebut hanya bertahan hidup selama 20 hari.
- ✓ 1904, Hannig berhasil membuat kultur embrio pada *Crucifera*.
- ✓ 1909, Kuster mencoba membuat kultur protoplast namun gagal.
- ✓ 1922, Knudson berhasil mengecambahkan biji anggrek secara *in vitro*.

- ✓ 1922, Kotte dan Robbin berhasil membuat kultur organ pertama kali, pada ujung akar kapri (*Pisum sativum*) dan jagung (*Zea mays*), dengan penambahan ekstrak yeast pada media.
- ✓ 1925, Laibach berhasil membuat kultur embrio pada hasil persilangan interspesifik *Linum*.
- ✓ 1929, kultur embrio *Linum* dilakukan untuk menghindari inkompatibilitas silang.
- ✓ 1934, Gautheret melakukan kultur *in vitro* jaringan kambium pada beberapa tanaman berkayu dan menghasilkan kultur kalus pertama namun gagal, hanya tumbuh 6 bulan. Saat penelitian ini dilakukan auksin belum ditemukan.
- ✓ 1934, White berhasil melakukan kultur akar tanaman tomat (*Solanum lycopersicum*).
- ✓ 1936, Larue melakukan kultur embrio berbagai tanaman *Gymnospermae*.
- ✓ 1939, Gautheret dan Nobecourt melakukan kultur jaringan pada wortel (*Daucus carota*) sedangkan White melakukan penelitian pada tembakau (*Nicotiana tabacum*) dan berhasil membuat kultur kalus yang berkesinambungan dengan menambahkan auksin pada media.
- ✓ 1940, Gautheret melakukan kultur jaringan kambium *Ulmus* untuk mempelajari pembentukan tunas adventif.
- ✓ 1941, van Overbeek melakukan penambahan air kelapa pertama kali pada kultur embrio *Datura*.
- ✓ 1941, White dan Braun melakukan kultur *in vitro* jaringan tumor crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*) dan sel-sel dapat tumbuh membelah pada kultur tanpa auksin.
- ✓ 1944, Skoog melakukan kultur tembakau pertama kali untuk mempelajari pembentukan tunas adventif.
- ✓ 1945, Loo melakukan penelitian kultur ujung batang *Asparagus*.
- ✓ 1946, Ball mengembangkan pertama kali mikropropagasi kultur tunas pucuk.
- ✓ 1948, Skoog dan Tsui berhasil melakukan pembentukan tunas dan akar adventif dari tembakau, dengan menyeimbangkan ratio auksin/adenin.

- ✓ 1950, Ball berhasil meregenerasi organ dari jaringan kalus *Sequoia sempervirens*.
- ✓ 1952, Morel dan Martin menghasilkan tanaman dahlia bebas virus, dari kultur meristem.
- ✓ 1952, Morel dan Martin mengaplikasikan mikrografting pertama kali.
- ✓ 1959, Gautheret berhasil memublikasi pertama kali tentang kultur jaringan tanaman.
- ✓ 1960, Kanta berhasil melakukan fertilisasi pertama kali secara *in vitro* pada *Papaver rhoeas*.
- ✓ 1960, Cocking melakukan degradasi enzimatik dinding sel untuk menghasilkan protoplas.
- ✓ 1960, Morel berhasil melakukan propagasi vegetatif pada anggrek melalui kultur meristem.
- ✓ 1962, Murashige dan Skoog memperkenalkan medium Murashige & Skoog (MS).
- ✓ 1964, Guha dan Maheswari berhasil membuat tanaman haploid *Datura* dari kultur polen.
- ✓ 1964, Mathes melakukan regenerasi tunas dan akar pada jaringan kalus *Populus tremuloides*.
- ✓ 1965, Aghion-Prat berhasil menginduksi pembungaan tembakau secara *in vitro*.
- ✓ 1967, Pierik berhasil menginduksi pembungaan *Lunaria annua* secara *in vitro* melalui vernalisasi.
- ✓ 1969, Eriksson dan Jonassen berhasil melakukan isolasi protoplas dari kultur suspensi *Hapopappus gracilis*.
- ✓ 1970, Power dkk. berhasil melakukan fusi protoplas.
- ✓ 1972, Carlson dkk. berhasil melakukan hibridisasi interspesifik melalui fusi protoplas 2 spesies tembakau.
- ✓ 1976, Power dkk. melakukan hibridisasi interspesifik melalui fusi protoplas pada *Petunia hybrida* dan *Petunia parodii*.

- ✓ 1978, Melchers dkk. melakukan somatik hibridisasi antara tomat dan kentang.
- ✓ 1982, Zimmermann melakukan fusi protoplas melalui rangsangan elektrik.
- ✓ 1984, Paszkowski dkk. melakukan transformasi sel tanaman dengan DNA plasmid.
- ✓ 1985, Horsch dkk. berhasil melakukan infeksi dan transformasi potongan daun dengan *A. tumefaciens* dan regenerasi tanaman transformasi.

## **B. Manfaat Kultur Jaringan**

### **1. Kultur Jaringan Dalam Bidang Pertanian (*Agricultural*)**

Kultur jaringan banyak dimanfaatkan dalam bidang pertanian seperti penyediaan bibit dalam jumlah besar, menghasilkan bibit unggul, menghasilkan bibit yang bebas hama dan penyakit, dan memperbaiki sifat-sifat tanaman. Perbaikan sifat tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan fusi protoplas. Fusi protoplas merupakan pengabungan protoplast tanaman untuk menghasilkan sifat-sifat yang diinginkan. Dengan fusi protoplast juga dimungkinkan menghasilkan tanaman yang berukuran besar (poliploidi). Selain menghasilkan tumbuhan berukuran besar melalui kultur jaringan juga dapat dihasilkan tumbuhan berukuran (haploid). Tumbuhan haploid dapat dihasilkan melalui kultur antera maupun kultur ovul.

Perbaikan sifat tanaman juga dapat dilakukan dengan transfer gen. Transfer gen dilakukan dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*. Dengan bantuan bakteri tersebut dimungkinkan terjadinya perakitan gen-gen tanaman sesuai yang dibutuhkan. Teknologi transformasi gen dapat menghasilkan tanaman dengan varietas bibit unggul (hasil lebih tinggi), menghasilkan tanaman bebas virus dan bakteri, tanaman dengan kandungan senyawa berkhasiat lebih tinggi, tanaman tahan terhadap salinitas, tahan terhadap kekeringan, maupun tanaman yang tahan terhadap stress.

### **2. Kultur Jaringan Untuk Tujuan Pengobatan (*Medicine*)**

Kultur jaringan merupakan salah satu cara yang efisien untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berkhasiat obat. Kultur jaringan dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk memperoleh metabolit sekunder, karena dapat



dilakukan modifikasi media, zat pengatur tumbuh, sumber karbon untuk menghasilkan metabolit yang diinginkan. Keuntungan lain penggunaan kultur jaringan ini untuk produksi alkaloid adalah produksinya dapat diatur, kualitas dan hasil produksi lebih konsisten, biaya produksi lebih kecil, dan mengurangi penggunaan lahan.

Beberapa tanaman yang penting dalam pengobatan dan telah dilakukan dalam skala industri antara lain: *Lithospermum erythrorhizon*, *Catharanthus roseus*, *Dioscorea deltoidea*, *Digitalis lanata*, *Panax notoginseng*, *Taxus wallichiana* dan *Podophyllum hexandrum*. Untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang berkhasiat obat dalam skala besar dengan kultur sel dan kultur rambut akar (*hairy root*).

### **3. Kultur Jaringan Untuk Tujuan Konservasi**

Pada tahun 2004 telah dikembangkan kultur jaringan untuk meningkatkan hasil tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat terutama tanaman yang bersatus *endangered* (terancam punah) atau tanaman yang lambat pertumbuhannya atau sulit berkembang. Kultur jaringan dapat meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder yang bekhasiat obat seperti obat kanker. Kultur jaringan juga dapat membantu konservasi secara *ex-situ* dari berbagai tanaman yang terancam punah. Beberapa diantaranya: *Plumbago zeylanica* L., *Nicotiana tabacum* L., *Artemisia absinthium* L., *Rosa damascena* Mill., *Althea rosea* L., *Stevia rebaudiana* Bertoni., *Jatropha curcas* L., *Phalaenopsis*, *Piper nigrum* L., *Solanum tuberosum* L., *Araucaria heterophylla* Salisb. Franco., *Taxus wallichiana* Zucc., dan *Taxus wallichiana*.

Penerapan konservasi *in-vitro* dapat dilakukan melalui penyimpanan dalam keadaan tumbuh (jangka pendek), penyimpanan pertumbuhan minimal (jangka pendek dan menengah) dan penyimpanan dengan pembekuan (jangka panjang). Melalui teknik *in-vitro* pertumbuhan minimal, bahan tanaman dapat disimpan dalam waktu hingga 20 tahun.

Penyimpanan dalam keadaan tumbuh adalah cara pemeliharaan dengan melakukan pemindahan tanaman (sub-kultur) secara rutin pada media yang sama agar

biakan tetap hidup. Untuk menghindari terjadinya mutasi dan menjaga viabilitas tanaman maka zat pengatur tumbuh yang digunakan diusahakan seminimal mungkin.

Penyimpanan pertumbuhan minimal adalah dengan menekan pertumbuhan biakan dengan menurunkan proses pembelahan sel dan proses metabolisme yang hampir mendekati nol. Beberapa hal yang dilakukan dalam teknik pertumbuhan minimal antara lain: penurunan temperatur lingkungan, menggunakan regulator osmotik, pengenceran media, penggunaan zat penghambat tumbuh. Untuk menekan pertumbuhan tersebut dilakukan manipulasi suhu, pemberian zat penghambat tumbuh (Paclobutrazol, CCC, Ancymidol), retardan (ABA), pemberian stabilisator osmotik seperti manitol dan sorbitol serta pemiskinan media, terutama unsur makronya dari  $\frac{1}{2}$  sampai  $\frac{1}{10}$  nya. Penyimpanan dengan teknik pembekuan atau jangka panjang dengan cara ini proses metabolisme dari sel, jaringan maupun organ yang disimpan dihentikan sehingga tidak ada proses pertumbuhan.

#### **SOAL LATIHAN**

1. Jelaskan prinsip dasar dalam kegiatan kultur jaringan!
2. Jelaskan bagaimana peranan perkembangan ilmu dan teknologi dalam pengembangan penelitian dan aplikasi kultur jaringan dalam kehidupan manusia!
3. Jelaskan bagaimana peranan kultur jaringan dalam meningkatkan kesejahteraan manusia dan berikan contohnya minimal 4!
4. Jelaskan bagaimana peranan kultur jaringan dalam konservasi tumbuhan!

## **BAB II**

### **FASILITAS DAN TEKNIK UNTUK KULTUR JARINGAN TANAMAN**

#### **Capaian Pembelajaran:**

4. Mahasiswa dapat mendesain laboratorium kultur jaringan.
5. Mahasiswa dapat menjelaskan fasilitas dan alat dalam laboratorium kultur jaringan beserta fungsinya.
6. Mahasiswa dapat menjelaskan fasilitas alternatif untuk pengembangan kultur jaringan jika fasilitas yang diperlukan tidak terpenuhi.

#### **A. Pendahuluan**

Kultur jaringan tanaman merupakan budidaya sel, jaringan, dan organ secara aseptik. Teknik kultur jaringan (*in vitro*) mensyaratkan kondisi steril baik ruang, peralatan, bahan maupun seluruh rangkaian kerjanya. Hal tersebut disebabkan pertumbuhan eksplan di dalam kultur harus selalu dalam kondisi aseptik. Untuk itu semua tahapan pelaksanaan teknik kultur *in vitro* harus dilaksanakan di dalam laboratorium dan harus ditunjang oleh organisasi serta perlengkapan laboratorium yang memadai.

#### **B. Laboratorium Kultur Jaringan**

Laboratorium kultur jaringan tidak harus dibangun ruangan baru. Ruang-ruang di dalam laboratorium yang sudah ada dapat direnovasi untuk keperluan kultur jaringan. Walaupun dapat memanfaatkan ruangan laboratorium yang sudah ada, namun demikian pendirian laboratorium baru merupakan langkah yang terbaik, karena desainnya dapat disesuaikan dengan kebutuhan.

Laboratorium kultur jaringan sebaiknya mempunyai pembagian ruangan yang diatur sedemikian rupa sehingga tiap kegiatan terpisah satu dengan yang lainnya, tetapi masih dapat saling berhubungan dan mudah dicapai. Dalam bab ini akan diuraikan skema umum laboratorium kultur jaringan, prinsip dan fungsi ruang serta peralatan yang ada di dalamnya.

Laboratorium yang baik untuk pekerjaan teknik kultur jaringan harus memenuhi kriteria aman, bersih, memiliki organisasi dan penataan ruang yang sesuai. Lokasi dari laboratorium itu sendiri sebaiknya jauh dari lingkungan pabrik atau bengkel yang sering menimbulkan polusi. Kondisi bagian dalam laboratorium mutlak harus bersih, mulai dari lantai, dinding, meja, alat-alat yang digunakan, maupun udara di ruangan laboratorium tersebut. Laboratorium diusahakan semaksimal mungkin bebas dari debu, karena debu adalah sumber kontaminan yang paling potensial. Untuk meminimalisasi kontaminasi yang disebabkan oleh debu maka laboratorium dapat dirancang menjadi ruangan tertutup tanpa ada ventilasi. Jendela-jendela dapat dibuat permanen dari kaca (tidak bisa dibuka), namun masih memungkinkan ditembus oleh cahaya. Ruangan kultur jaringan sebaiknya dilengkapi dengan pengatur suhu udara (dipasang Air Conditioner/AC) sehingga suhu ruangan dapat diatur sesuai dengan kebutuhan. Suhu ruangan di dalam laboratorium kultur jaringan berkisar 25-28°C.

Lantai laboratorium juga harus dibersihkan secara rutin dengan antiseptik, meja dan dinding juga harus dibersihkan dengan larutan antiseptik umumnya permukaan meja dan dinding dilapisi dengan porselin supaya kedap air dan mudah dibersihkan. Ruangan di dalam laboratorium harus dijaga tetap bersih dan bebas dari debu, hewan kecil dan insekta. Setiap orang yang akan masuk laboratorium harus melepas sepatunya dan menggantinya dengan alas kaki yang ada di dalam laboratorium dan harus mengenakan jas praktikum. Kebersihan laboratorium secara umum sangat menentukan keberhasilan kerja kultur jaringan. Sarana dasar seperti aliran listrik, air yang cukup dan gas harus dipunyai.

Pelaksanaan kultur jaringan memiliki beberapa tahapan yaitu persiapan, penanaman, dan pemeliharaan. Oleh karena itu pembagian ruangan laboratorium kultur jaringan yang baik meliputi: ruang persiapan, ruang transfer (inokulasi) atau ruang steril, ruang kultur (inkubator dan ruang *plantlet*) dan ruang aklimatisasi.

#### ✓ **Ruang persiapan**

Ruangan ini dipergunakan sebagai tempat untuk mempersiapkan eksplan, medium, dan alat-alat. Ruang persiapan biasanya dibagi menjadi beberapa ruangan kecil yang dipergunakan untuk menyimpan medium dan alat-alat yang sudah steril,

untuk menyimpan alat-alat gelas, bahan-bahan kimia dan pembuatan medium (ruang timbang), dan ruangan untuk mencuci. Persiapan eksplan yang dilakukan meliputi pencucian, pemotongan/pembuangan bagian-bagian tanaman yang tidak dipergunakan serta perlakuan awal untuk mengurangi kontaminan yang ada dipermukaan tanaman. Persiapan medium meliputi penimbangan bahan kimia medium, pengenceran medium, penuangan kedalam wadah kultur dan sterilisasi. Sesuai dengan fungsinya, fasilitas yang dibutuhkan didalam ruangan ini adalah meja tempat meletakkan alat-alat pemanas, meja untuk alat-alat timbang, meja untuk bekerja dan tempat mencuci, semua meja adalah kongkrit (statis dari beton) dan beralas porselin.

Peralatan yang diletakkan di dalam ruangan ini terdiri dari: oven, magnetic stirrer dengan atau tanpa pemanas, alat-alat gelas, lemari alat-alat gelas; alat-alat untuk mencuci, rak pengering, alat-alat diseksi (spatula, pisau, scalpel, pinset, glinting, cutter).

#### ✓ **Ruang timbang**

Ruangan ini dipergunakan untuk tempat menyimpan bahan-bahan kimia medium dan mempersiapkan medium kultur. Persiapan medium kultur meliputi penimbangan bahan kimia medium, pengenceran larutan stok, membagi-bagi dalam botol kultur dan sterilisasi. Ruang timbang berhubungan langsung dengan ruang persiapan. Fasilitas yang diperlukan dalam ruangan ini adalah meja kerja dan meja untuk alat-alat timbang beralas porselin. Peralatan yang diletakkan diruangan ini terdiri dari: timbangan analitik, lemari es dan freezer untuk menyimpan larutan stok, hot plate dengan magnetik stirrer, bunsen dengan kaki tiga, pH meter, lemari bahan kimia dan alat-alat (aluminum foil, kertas timbang, kertas saring).

#### ✓ **Ruang stok**

Ruang stok dipergunakan untuk menyimpan alat-alat steril dan medium yang sudah jadi (steril). Didalam pelaksanaan teknik kultur jaringan, sebelum penanaman eksplan maupun subkultur dilakukan, medium kultur harus sudah disiapkan minimum tiga hari sebelum diperlukan. Medium yang sudah jadi harus disimpan didalam ruangan yang dingin dan gelap. Fasilitas yang diperlukan diruangan ini berupa meja

kerja beralas porselin. Ruang stok harus berhubungan langsung 2 arah, satu arah dengan ruang persiapan (setelah media disterilisasi diruang persiapan, dapat langsung dibawa keruangan ini) dan arah yang lain dengan ruang transfer atau ruang steril, ruangan ini meskipun tidak harus steril tetapi kebersihannya harus tetap terjaga. Alat-alat yang terdapat di ruangan ini meliputi: kereta dorong, rak-rak untuk meletakkan medium steril, oven untuk menyimpan alat-alat steril.

#### ✓ **Ruang steril / transfer**

Ruang transfer merupakan ruangan dimana semua kegiatan aseptis dimulai. Kegiatan yang dilakukan meliputi : sterilisasi, isolasi bagian-bagian tanaman, dan penanaman eksplan dalam medium. Kegiatan subkultur, sterilisasi medium dengan ultrafiltrasi juga dilakukan diruangan ini. Ruangan ini mutlak harus steril, sehingga sedapat mungkin bebas dari debu dan hewan kecil, dinding ruangan dilapis porselin atau bahan lain yang kedap air dan mudah dibersihkan. Ruangan ini juga dilengkapi dengan tempat cuci tangan sehingga memudahkan petugas yang akan memulai dengan pekerjaan aseptis, pengatur suhu (AC), lampu ultra violet dan lampu TL biasa. Ruang transfer harus terisolir sedemikian rupa tetapi masih dapat berhubungan dengan ruang stok, ruang inkubasi dan ruang mikroskop. Pintu penghubung harus selalu dalam keadaan tertutup.

Ruang transfer dilengkapi dengan alat-alat sebagai berikut: *laminar air flow cabinet*, peralatan utama untuk melakukan pekerjaan aseptis, *dissecting microscope*, alat-alat diseksi (*scalpel*, *pinset*, *spatula*, *gunting*, *jarum*), *hand sprayer* untuk alkohol, *bunsen burner*/lampu alkohol/*bacterincinerator*, meja beralas kaca/*formica* dengan laci untuk menyimpan alat-alat steril, kapas dan alkohol.

#### ✓ **Ruang inkubasi/kultur**

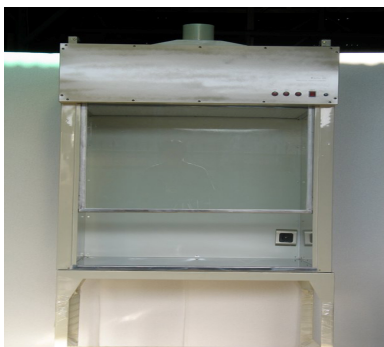
Ruang kultur merupakan ruang besar dengan kemungkinan perluasan bila diperlukan. Kebersihannya harus diperhatikan dan sedapat mungkin dihindari terlalu banyak keluar masuknya orang-orang yang tidak berkepentingan. Ruangan ini dipergunakan untuk memelihara eksplan yang telah ditanam pada medium secara aseptis. Kultur yang telah tumbuh dan memperbanyak diri, secara teratur harus

disubkultur. Tergantung dari jenis eksplan dan tipe kultur, subkultur dilakukan setiap 3-6 minggu sekali, hal ini berarti tiap bulan ada pelipatan jumlah kultur.

Botol-botol kultur diatur dengan menempatkannya pada rak-rak terbuka yang bertingkat (3-4 tingkat) dengan lampu fluorescent, jarak tiap tingkat 40-50 cm. Jarak antara rak harus diatur sedemikian rupa sehingga memudahkan lalulintas pemeriksa kultur. Di dalam ruang kultur, lingkungan fisik diatur sedemikian rupa sehingga mendukung pertumbuhan yang optimal, untuk itu perlu ada pengaturan terhadap suhu dan cahaya. Unsur-unsur dan cahaya yang perlu diperhatikan adalah kualitas, lama penyinaran dan intensitas cahaya.

### C. Peralatan Dalam Kultur Jaringan

Keberhasilan kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh peralatan yang digunakan. Berapa alat yang harus ada dalam kultur jaringan yaitu laminar air flow (lemari beraliran udara bersih), oven, autoklaf, *hotplate*, timbangan, rak, botol kultur, erlemeyer, magnetik striter, pH meter, blade, skalpel, pinset, lampu bunsen, cawan petri, gelas ukur, gelas Beacker, pipet tetes, spatula, destilator, shaker, dan lemari es (Gambar 1). Fungsi dari masing-masing peralatan dalam kultur jaringan termuat dalam Tabel 1. Masing masing alat memiliki fungsi yang berbeda. Selain peralatan dibutuhkan juga berbagai jenis bahan seperti bermacam media Murashige-Skoog (MS), media Vacint Went, HCl. NaOH, agar, sukrosa, zat pengatur tumbuh (kinetin, BAP, NAA, 2,4-D, IAA).



*Laminar air flow*



*Autoklave*



Autoklaf dengan posis tutup di samping



Syring dan alat saring



Botol kultur yang dilengkapi dengan tutup



Praktikan yang sedang melakukan penanaman di *Laminar air flow*



Praktikan sedang memotong eksplan di *Laminar air flow*



Rak untuk inkubasi tanaman





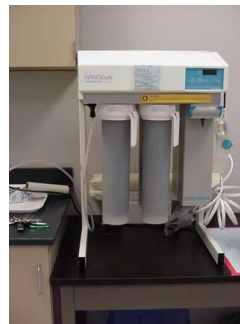
Shaker dengan erlemeyer



Botol kultur



Media tanam



Destilator



Shaker yang dilengkapi dengan pengaturan kecepatan otomatis



Hot plate (pemanas)

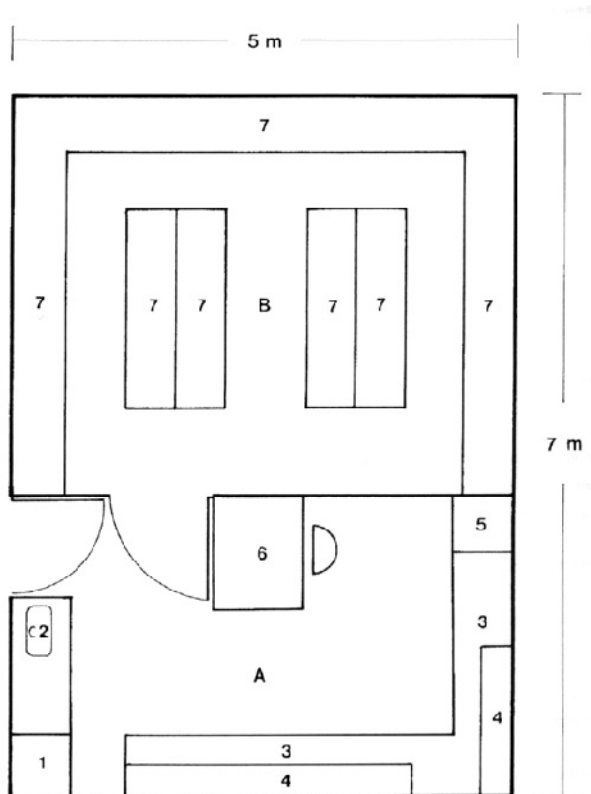
Gambar 1. Alat-alat dan fasilitas dalam laboratorium kultur jaringan.

Tabel 1. Fungsi dari berbagai peralatan yang dibutuhkan dalam kultur jaringan.

Nama alat	Fungsi
<i>Laminar Air-flow Cabinet</i> (Lemari beraliran udara bersih)	Kabinet yang digunakan untuk isolasi, inokulasi dan subkultur. <i>Laminar air-flow cabinet</i> ini harus steril dan bebas dari debu yang dilengkapi dengan UV, lampu neon dan blower. Kabinet ini dapat diganti dengan enkas (kotak tertutup yang terbuat dari kaca atau triplek dengan permukaan licin putih.
<i>Autoclave</i>	Untuk mensterilkan alat-alat seperti botol kultur, pinset, scalpel, dan media kultur.
Destilator	Untuk destilasi air sehingga diperoleh <i>aquadest</i>
<i>Hotplate</i> (pemanas)	Bersama dengan stirrer berperan untuk menghomogenkan senyawa-senyawa dalam media kultur dan untuk memanaskan media padat (agar)
Lemari es	Untuk menyimpan stok-stok media kultur agar tidak cepat rusak
Rak inkubasi	Untuk meletakkan botol-botol kultur setelah proses penanaman yang dilengkapi dengan lampu neon sebagai sumber cahaya, diletakkan pada ruang berAC sehingga suhu terkontrol, dan harus dijaga kebersihannya. Rak dapat terbuat dari kaca atau triplek yang permukaannya putih
Shaker (pengocok)	Alat penggojog botol kultur dan digunakan untuk mengocok eksplan yang ditanam pada media kultur cair.
Botol-botol kultur	Botol-botol tempat media dan untuk menanam eksplan kultur jaringan. Ukuran botol bervariasi dan disesuaikan dengan kebutuhan kultur jaringan. Pemilihan botol diusahakan yang mulut botolnya kecil, bening dan tahan terhadap tekanan dan suhu tinggi.
Syring dan saringan sartorius	Menyaring zat-zat khususnya zat pengatur tumbuh, vitamin yang bersifat termolabil.
Erlemeyer	Untuk penyimpanan larutan stok dan

### LATIHAN SOAL

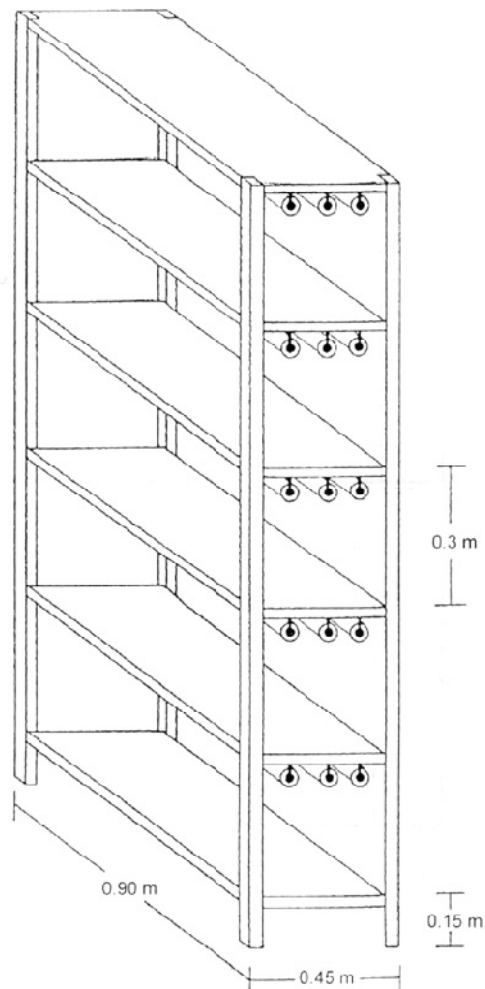
Berikut ini merupakan gambar desain laboratorium untuk kultur jaringan tumbuhan dan rak untuk inkubasi.



A. Laboratorium

B. Ruang inkubator

1. Autoklaf
2. Tempat cuci
3. Meja kerja
4. Rerigator
5. Dinding kabinet
6. Ruang pemindahan
7. Tutup inkubasi



Bandingkanlah gambar di tersebut dengan fasilitas yang ada di laboratorium FKIP.

1. Jelaskan bagian-bagian yang harus dibenahi pada laboratorium FKIP sehingga dihasilkan laboratorium yang memenuhi standar untuk pengerjaan kultur jaringan.
2. Jelaskan alternatif yang kamu tempuh jika peralatan-peralatan seperti di atas tidak ada, padahal kamu harus melakukan penelitian pembuatan kultur jaringan.

### **BAB III**

#### **MEDIA KULTUR JARINGAN**

##### **Capaian Pembelajaran:**

3. Mahasiswa dapat menjelaskan jenis-jenis media yang digunakan dalam kultur jaringan.
4. Mahasiswa dapat menjelaskan komponen makro dan mikronutrien yang terdapat pada berbagai jenis media.

##### **A. Pendahuluan**

Media merupakan faktor utama dalam perbanyakan dengan kultur jaringan. Keberhasilan perbanyakan dan perkembangbiakan tanaman dengan metode kultur jaringan secara umum sangat tergantung pada jenis media. Media tumbuh pada kultur jaringan sangat besar pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan serta bibit yang dihasilkannya. Oleh karena itu, macam-macam media kultur jaringan telah ditemukan sehingga jumlahnya cukup banyak. Nama-nama media tumbuh untuk eksplan ini biasanya sesuai dengan nama penemunya. Media tumbuh untuk eksplan berisi kualitatif komponen bahan kimia yang hampir sama, hanya agak berbeda dalam besarnya kadar untuk tiap-tiap persenyawaan.

Pada umumnya komposisi utama media tanam kultur jaringan, terdiri dari hormon (zat pengatur tumbuh) dan sejumlah unsur yang biasanya terdapat di dalam tanah yang dikelompokkan ke dalam unsur makro, unsur mikro. Hasil yang lebih baik akan dapat kita peroleh bila, kedalam media tersebut, ditambahkan vitamin, asam amino, dan hormon, bahan pemat media (agar), glukosa dalam bentuk gula maupun sukrosa, air destilata (akuades), dan bahan organik tambahan.

##### **B. Komponen media kultur Jaringan**

###### **1. Zat anorganik**

Penumbuhan tanaman secara *In vitro* membutuhkan zat-zat yang sama dengan tumbuhan yang ditanam secara *in vivo*. Makronutrient merupakan kelompok zat yang dibutuhkan dalam konsentrasi besar hingga lebih dari 0.5 mM/l. Makronutrien

antara lain nitrogen, potassium, phosphorus, calcium, magnesium and sulphur. Nitrogen yang digunakan biasanya dalam bentuk ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Dalam media Nitrogen dan kalium dibutuhkan sekitar 25 mM/l. Makronutrien lainnya dibutuhkan dengan konsentrasi 1-3 mM/l. Micronutrient merupakan nutrien yang dibutuhkan dengan konsentrasi kurang dari 0.05 mM/l. Beberapa diantaranya iron, manganese, zinc, boron, copper and molybdenum. Zat-zat tambahan atau yang dikenal dengan inorganic elements dibutuhkan dalam jumlah yang sangat kecil namun sangat esensial dalam pertumbuhan tanaman.

Unsur makro dibutuhkan dalam jumlah cukup besar, pada umumnya diberikan dalam bentuk persenyawaan. Beberapa persenyawaan makronutrien yang umum digunakan pada medium kultur jaringan, antara lain:  $\text{KNO}_3$ ;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NaNO}_3$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{KCl}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

Nitrogen diberikan dalam bentuk persenyawaan yang bermacam-macam, antara lain:  $\text{KNO}_3$ ;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NaNO}_3$ ;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Kebutuhan N terbesar adalah untuk menyusun asam-asam nukleat, protein, sebagai koenzym atau persenyawaan lain yang mengandung N seperti klorofil, alkaloid, derivat purin dan pirimidin dan beberapa hormon endogen. Sumber nitrogen pada medium kultur adalah ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ). Jumlah ion ammonium yang digunakan berkisar antara 2-8 mM, sedangkan nitrat berkisar antara 25-40 mM. Pengambilan unsur nitrat memerlukan pH rendah, sebaliknya pengambilan ammonium menyebabkan pembebasan  $\text{H}^+$  sehingga medium menjadi asam. Medium Murashige dan Skoog (MS) menyediakan nitrogen dalam bentuk garam  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , ini merupakan strategi yang baik dan mempunyai keuntungan ganda, karena selain sumber N nya lengkap juga dalam bentuk garam efeknya terhadap penurunan pH medium berkurang.

Fosfor diberikan pada medium kultur jaringan dalam bentuk persenyawaan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  atau  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Ion  $\text{PO}_4^-$  total yang diberikan pada medium bervariasi antara 0,5 - 20 mM/l. Unsur P didalam sel diubah menjadi persenyawaan RNA dan DNA, zat-zat yang sangat penting yang bertanggung jawab

atas sifat-sifat keturunan. Unsur P diperlukan sebagai aktivator enzim untuk memacu pertumbuhan pada jaringan meristematik. Kelebihan unsur P dapat menghambat pertumbuhan eksplan, karena akan terjadi persaingan penyerapan dengan unsur lain seperti seng (Zn), besi (Fe) dan tembaga (Cu).

Kalium diberikan pada medium dalam bentuk  $\text{KNO}_3$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  atau  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ; dan  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Ion  $\text{K}^+$  total yang diberikan pada medium bervariasi antara 1,837-25.18 mM/l. Unsur K sangat diperlukan untuk memacu pembelahan sel, sintesa karbohidrat dan protein, pembuatan klorofil serta untuk mereduksi nitrat. Kalium berpengaruh pada hidratisasi, menambah atau mengurangi hidratisasi pada misel sehingga mempengaruhi keluar masuknya nutrisi ke dalam sel.

Sulfur atau belerang diberikan pada medium dalam bentuk  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Pemberian belerang berkisar antara 0,75 - 3 mM/l. Sulfur ada didalam beberapa molekul protein dan koenzim. Memacu perkembangan akar, juga berguna untuk ketahanan atau proteksi tubuh tumbuhan. Belerang diserap dalam bentuk  $\text{SO}_4^{2-}$ , antara lain dijadikan aneurin, biotin, persenyawaan asam amino yang ada belerangnya misalnya, cystein, methionin.

Calcium atau kapur diberikan pada medium dalam bentuk  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Pemberian ion Ca berkisar antara 1-3 mM/l. Pemakaian Ca-nitrat ada kelemahannya karena sangat higroskopis, sehingga didalam wadahnya seringkali (dijumpai kristalnya berair. Sebaiknya Ca-nitrat dibuat larutan stok dan disimpan didalam kulkas. Ca-fosfat juga ada kelemahannya yaitu tidak mudah larut. Untuk melarutkannya, sejumlah tertentu Ca-fosfat dimasukan kedalam Erlenmeyer 50 ml, kemudian diberi beberapa tetes  $\text{HCl}$  0,1 N campuran ini digojok sambil dipanasi sampai larut (tampak jernih). Calcium diperlukan untuk pembentukan dinding primitif, sebagai Capectat yaitu bagian integral dari dinding sel, penting sebagai kation selular dan kofaktor enzim. Calcium mempengaruhi hidratisasi, permeabilitas dan penyerapan nutrient. Calcium juga mempengaruhi tingginya pH, menetralkan racun, misalnya pada asam oksalat. Asam oksalat dengan Ca akan menjadi Ca-oksalat

berbentuk kristal dan diisolasi atau dimumifikasikan ikklam sel tertentu menjadi sel sel kristal.

Magnesium terutama diberikan pada medium dalam bentuk  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Magnesium diperlukan sebagai elemen utama dalam pembentukan klorofil, berperan penting sebagai aktivator enzim terutama dalam proses fosforilasi dan sintesis protein dengan cara membentuk kompleks enzim-substrat.

Unsur hara mikro adalah unsur yang diperlukan dalam jumlah sedikit. Fungsinya belum diketahui secara pasti, tetapi tidak adanya zat-zat ini dapat menyebabkan kelainan pertumbuhan. Air dan bahan kimia yang tingkat kemurniannya rendah seringkali terkontaminasi oleh unsur hara mikro. Bentuk persenyawaan hara mikro yang umum digunakan pada beberapa medium kultur :  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; KI;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Fe III citrate;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; NaFeEDTA;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ ; Fe III tartrate.

Besi diperlukan dalam jumlah sedikit lebih banyak daripada unsur mikro yang lain, diberikan dalam bentuk chelat. Pemberian Fe bersama-sama dengan NaEDTA dimaksudkan agar besi tetap pada jangkauan pH yang luas dalam jangka waktu yang lama sehingga dapat diserap oleh jaringan tanaman. Fe berperan penting dalam sintesis klorofil, konfersi energi pada fotosintesis dan respirasi dengan melakukan reduksi oksidasi, bagian dari sitokrom. Besi diberikan pada medium kultur jaringan berupa  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Fe III citrate;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; NaFeEDTA  $2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ ; Fe III tartrate.

Boron diberikan pada medium kultur sebagai asam borak (*boric acid*,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ). Berperan dalam translokasi karbohidrat, juga terlibat dalam difsrensiasi seluler dan perkembangan. Ikatan boron organis memungkinkan adanya diferensiasi dan penyusunan struktur halus dari dinding sel sehingga memudahkan transport karbohidrat dan penyerapan ion kedalam sel; sebagai aktifator dan inaktifator bagi zat pengatur tumbuh. Kalau boron kurang zat pengatur tumbuh menjadi terlalu banyak sehingga menghambat pertumbuhan.



Molybdenum diberikan pada medium sebagai sodium molybdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) berpartisipasi pada konfersi nitrogen ke ammonia dan fiksasi nitrogen, ikut dalam metabolisme protein, sintesis asam askorbat, kofaktor enzim.

Manganese merupakan elemen esensial yang terdapat pada membran kloroplas, berperan sebagai aktifator enzim dengan bertindak sebagai perantara pada proses fosforilasi atau sebagai gugus redok  $\text{Mn}^{2+}$ . Bahan pembentuk klorofil dan aktif dalam fotosintesa, metabolisme protein dan pembentukan vitamin C. Pada medium kultur diberikan dalam bentuk  $\text{MnSO}_4$ .

Cobalt merupakan elemen dari molekul vitamin B kompleks, esensial untuk fiksasi nitrogen. Pada medium kultur jaringan diberikan dalam bentuk persenyawaan Cobalt Oiloride ( $\text{CoCl}_2$ ).

Zincum berperan sebagai aktifator enzim, penyusun khlorofil, pemacu pembentukan zat pengatur tumbuh terutama IAA. Pada medium kultur jaringan diberikan dalam bentuk one sulfate ( $\text{ZnSO}_4$ ).

Cuprum merupakan bagian dari enzim, Cu bereaksi menjadi komponen phenolase, lactase dan askorbat oksidase. Ikut ambil bagian dalam proses fotosintesis dan reduksi nitrit. Cuprum diberikan pada medium kultur jaringan dalam bentuk Cupric sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).

Chlorine sebagai ion berpengaruh terhadap aktifitas enzim, memacu proses fotosintesis. Chlorine diberikan pada medium kultur jaringan berupa calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ).

## **2. Sumber karbon**

Gula merupakan sumber energi utama dalam kultur jarinagn. Secara alami tumbuhan dapat mengahsilkan gula melalui fotosintesis, namun dalam kultur in vitro tumbuhan tidak dapat berfotosintesis sehingga gula dibutuhkan sebagai sumber energi untuk dapat pertumbuhan, dan pembelahan sel. Karbon atau sumber energi yang banyak digunakan adalah sukrosa dengan konsentrasi 20-60g/l. Ketika media di autolaf sukrosa akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruksosa. Fructose jika diautoklaf akan bersifat toksik. Monosakarida lain yang juga dapat digunakan sebagai sumber gula diantaranya glucose, sorbitol, dan raffinose. Carbohydrates juga akan

meningkatkan tekanan osmotik oleh karena itu pada kultur anthera konsentrasi yang digunakan dalam konsentrasi yang lebih tinggi (6-12%).

### **3. Suplemen organik (*Organic Supplements*)**

Suplemen organik merupakan zat organik yang ditambahkan ke dalam medium. Suplemen organik meliputi:

#### **✓ Vitamins:**

Vitamin merupakan zat organik yang dibutuhkan untuk proses metabolisme yang berfungsi sebagai kofaktor atau enzim. Untuk menghasilkan pertumbuhan optimum maka dalam medium ditambahkan berbagai vitamin seperti Thiamine (B1), nicotinic acid (B3), pyridoxine (B6), pantothenic acid (B5). Konsentrasi vitamin yang biasa digunakan berkisar 0.1 - 5mg/l

#### **✓ Amino acids**

Penambahan asam amino pada medium penting untuk merangsang pertumbuhan sel di dalam kultur protoplasma dan juga untuk menginduksi dan mempertahankan embriogenesis somatik. Nitrogen organik yang tereduksi lebih mudah diambil tumbuhan dibandingkan nitrogen anorganik. Beberapa asam amino yang digunakan seperti: L-glutamine, L-asparagine, L-cysteine, dan L-glycine.

#### **✓ Organik kompleks**

Organik kompleks merupakan kelompok suplemen yang tidak dapat didefinisikan. Beberapa contoh organik kompleks yaitu casein hydrolysate, coconut milk, yeast extract, orange juice, tomato juice. Organik kompleks ini biasanya ditambahkan ketika pemberian komponen lain menghasilkan pertumbuhan yang kurang baik. Casein hydrolysate telah terbukti banyak menghasilkan kultur jaringan yang baik dan potato extract juga digunakan dalam kultur anthera.

### **4. Arang aktif**

Arang aktif berfungsi untuk merangsang atau menghambat pertumbuhan tergantung jenis tanaman yang dikultur. Arang aktif terbukti merangsang pertumbuhan dan diferensiasi Anggrek (*orchids*), wortel dan tomat sebaliknya menghambat pertumbuhan tembakau dan kedelai. Arang aktif akan mengabsorpsi pigmen kecoklatan dan senyawa phenolik yang dihasilkan selama penkulturan dan

mereduksi toksisitas. Arang aktif juga dapat mengabsorpsi senyawa organik seperti zat pengatur tumbuh, vitamin sehingga dapat menghambat pertumbuhan. Pemberian arang aktif mengakibatkan media menjadi berwarna gelap sehingga dapat merangsang pembentukan akar.

## 5. Zat pengatur tumbuh

Zat pengatur tumbuh berfungsi untuk merangsang pembelahan sel dan mengatur pertumbuhan dan diferensiasi akar dan tunas (shoot) pada eksplan. Zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan dalam kultur jaringan yaitu auxins, cytokinin, gibberellins dan abscisic acid.

### ✓ Auxins

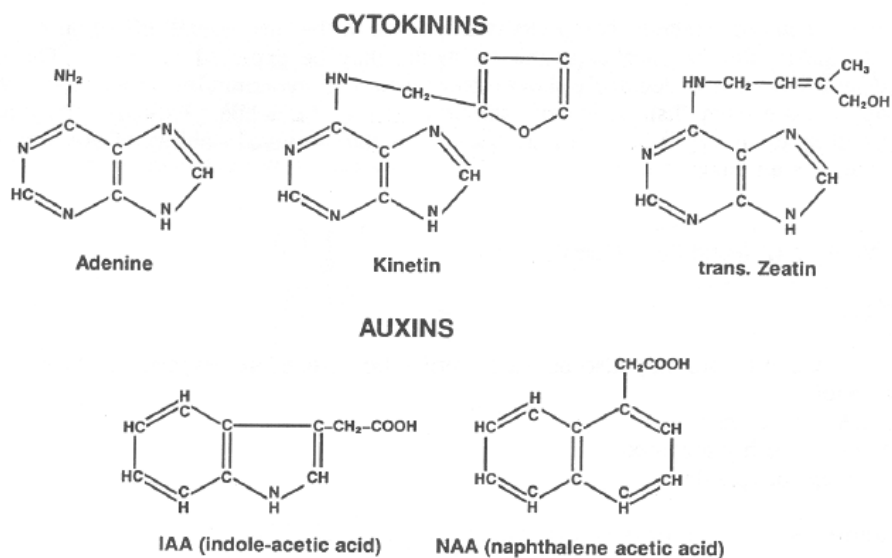
Auksin berfungsi menginduksi pembelahan sel, pemanjangan sel, apikal dominansi, pembentukan akar adventif, dan embriogenesis somatis. Pada saat konsentrasi auksi rendah maka auksin akan menginduksi inisiasi akar dan pada konsentrasi tinggi akan merangsang pembentukan kalus. Auksin sintetis yang banyak digunakan seperti *1-naphthaleneacetic acid* (NAA), *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D), *indole-3 acetic acid* (IAA), dan *indolebutyric acid* (IBA) (Gambar 1). IBA dan IAA bersifat *photosensitive* (sensitif terhadap cahaya) sehingga larutan stoknya harus disimpan dalam keadaan gelap. 2,4-D digunakan untuk menginduksi dan mengatur embriogenesis somatis.

### ✓ Cytokinins

Citokinin berfungsi merangsang pembelahan sel dan merangsang inisiasi dan pertumbuhan shoot secara *in vitro*. Citokinin sintetis yang banyak digunakan dalam kultur jaringan antara lain: Zeatin, *6-benzylaminopurine* (BAP), dan kinetin, 2-iP (Gambar 1). Sitokinin bertindak mengatur dominansi apikal dengan merangsang pembentukan tunas aksiler. Ketika digunakan dalam konsentrasi yang tinggi, sitokinin akan menghambat pembentukan akar dan menginduksi pembentukan tunas. Rasio auksin dan sitokinin dalam kultur akan menentukan arah morfogenesis. Rasio auksin dan sitokinin akan menentukan morfogenesis, jika rasio rendah akan menginisiasi pembentukan kalus maupun akar dan jika rasionya tinggi maka akan menginisiasi pembentukan shoot.

✓ Gibbrellins dan abscissic acid

Gibbrellins dan *abscissic acid*: merupakan kelompok Zat pengatur tumbuh yang jarang digunakan. *Gibbrellic acid* (GA<sub>3</sub>) banyak digunakan untuk pemanjangan internodus dan pertumbuhan meristem. Abscissic acid (ABA) digunakan hanya untuk embriogenesis somatis dan kultur spesies tumbuhan berkayu.



Gambar 1. Struktur formula beberapa zat pengatur tumbuh.

## 6. Zat pematat (*Solidifying agents*)

Zat pematat digunakan untuk membuat medium kultur jaringan semi padat atau medium padat. Medium padat memungkinkan eksplan kontak dengan zat nutrisi yang terdapat pada media (hanya salah satu sisi yang kontak dengan media) sedangkan permukaan yang lain kontak dengan udara. Agar merupakan polisakarida yang diperoleh dari rumput laut dan dapat mengikat air. Pada medium agar ditambahkan dengan konsentrasi 0.5% - 1 % (w/v). Agarose, merupakan ekstrak purifikasi dari agar yang digunakan dalam kultur protoplast.

## 7. pH

pH mempengaruhi absorpsi ion-ion dan juga kepadatan medium. pH optimum untuk kultur sebelum disterilisasi adalah 5,8. Jika pH kurang dari 4.5 atau lebih

tinggi dari 7.0 maka akan menghambat pertumbuhan dan perkembangan kultur in vitro. pH medium biasanya akan turun sekitar 0.3 -0.5 unit setelah diautoklaf.

Bahan-bahan yang digunakan dalam kultur jaringan sebelum digunakan terlebih dahulu disterilkan. Tabel 1 menunjukkan cara sterilisasi berbagai alat dan bahan yang digunakan dalam teknik kultur jaringan.

Tabel 1. Teknik sterilisasi yang digunakan dalam kultur jaringan

Teknik sterilisasi	Materi yang disterilasi
Stelisasi dengan uap/ diautoklaf (121°C dengan tekanan 15 psi selama 20-40 min)	Medium kultur, tabung kultur, bahan yang terbuat dari gelas dan bahan plastik.
Pemanasan kering ( <i>dry heat</i> ) (160-180°C selam 3 jam)	Peralatan (scalpel, gunting), bahan yang terbuat dari gelas, pipet, dan bahan plastik
Sterilisasi dengan pemanasan/pembakaran	Instruments (scalpel, guting), mulut dari botol kultur
Sterilisasi dengan penyaringan (dengan menggunakan membrane filter yang terbuat dari nitrat sellulosa atau asetat sellulosa dengan diameter pori 0.45-0.22µm)	Bahan-bahan yang tidak tahan terhadap pemanasan ( <i>thermolabile</i> ) seperti zat pengatur tumbuh asam amino, vitamin dan enzim.
Sterilisasi dengan menggunakan alkohol	Tangan yang bekerja dan Laminar air flow
Sterilisasi permukaan ( <i>surface sterilization</i> ) dengan menggunakan zat yang mengandung <i>Sodium hypochlorite</i> , <i>hydrogen peroxide</i> , dan <i>mercuric chloride</i> .	Eksplant

### C. Jenis-jenis media

Komposisi zat-zat yang dibutuhkan tumbuhan pada kultur *in-vitro* mirip dengan zat nutrisi yang dibutuhkan dalam *in vivo*. Kebutuhan setiap jenis tumbuhan memiliki kesamaan dan perbedaan. Hal tersebut mengakibatkan terjadinya variasi medium yang digunakan dalam kultur jaringan. Beberapa jenis media yang dikenal dalam kultur jaringan antara lain:

#### ✓ Medium Murashige-Skoog (MS)

Media Murashige-Skoog (Tabel 2) merupakan perbaikan komposisi media Skoog, terutama kebutuhan garam anorganik yang mendukung pertumbuhan optimum pada kultur jaringan tembakau. Media MS mengandung 40 mM N dalam bentuk  $\text{NO}_3$  dan 29 mM N dalam bentuk  $\text{NH}_4^+$ . Kandungan N ini, lima kali lebih tinggi dari N total yang terdapat pada media Miller, 15 kali lebih tinggi dari media tembakau Hildebrandt, dan 19 kali lebih tinggi dari media White. Kalium juga ditingkatkan sampai 20 mM, sedangkan Fosfor 1.25 mM. Unsur makro lainnya konsentrasinya dinaikkan sedikit. Pertama kali unsur-unsur makro dalam media MS dibuat untuk kultur kalus tembakau, tetapi komposisi MS ini sudah umum digunakan untuk kultur jaringan jenis tanaman lain. Media MS paling banyak digunakan untuk berbagai tujuan kultur.

Tabel 2. Komposisi medium Murashige-Skoog (MS)

Komposisi	Konsentrasi
Makronutrient	
Ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	1,650 mg/l
Boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	6.2 mg/l
Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	440 mg/l
Cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.025 mg/l
Magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	370 mg/l
Cupric sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.025 mg/l
Potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	170 mg/l
Ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	27.8 mg/l

Potassium nitrate (KNO <sub>3</sub> )	1,900 mg/l
Manganese sulfate (MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	22.3 mg/l
Potassium iodide (KI)	0.83 mg/l
Sodium molybdate (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0.25 mg/l
Zinc sulfate (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	8.6 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37.2 mg/l
Zat organik tambahan	
Inositol	100 mg/l
Niacin	0.5 mg/l
Pyridoxine HC	10.5 mg/l
Thiamine HCl	0.1 mg/l

#### ✓ Media Lin Staba

Media Lin Staba dikembangkan setelah penemuan media MS. Lin & Staba, menggunakan media dengan setengah dari komposisi unsur makro MS, dan memodifikasi : 9 mM ammonium nitrat yang seharusnya 10mM, sedangkan KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> yang dikurangi menjadi 0.5 Mm, tidak 0.625 mM. Larutan senyawa makro dari media Lin & Staba, kemudian digunakan oleh Halperin untuk penelitian embryogenesis kultur jaringan wortel.

#### ✓ Media Knop

Media Knop dapat juga digunakan untuk menumbuhkan kalus wortel. Kultur kalus, biasanya ditumbuhkan pada media dengan konsentrasi garam-garam yang rendah seperti dalam kultur akar dengan penambahan suplemen seperti glucosa, gelatine, thiamine, cysteine-HCl dan IAA.

#### ✓ Media White

Media White dikembangkan oleh Hildebrant untuk keperluan kultur jaringan tumor bunga matahari, ditemukan bahwa unsur makro yang dibutuhkan kultur tersebut, lebih tinggi dari pada yang dibutuhkan oleh kultur tembakau. Unsur F, Ca, Hg dan S pada media untuk tumor bunga matahari ini, sama dengan media untuk jaringan normal yang dikembangkan kemudian. Konsentrasi NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dan K<sup>+</sup> yang

digunakan Hildebrant ini lebih tinggi dari media white, tetapi masih lebih rendah dari pada media-media lain yang umum digunakan sekarang.

✓ **Media Knudson**

Media Knudson dikembangkan khusus untuk kultur anggrek. Tanaman yang ditanam di kebun dapat tumbuh dengan baik dengan pemupukan yang hanya mengandung N dari Nitrat. Knudson pada tahun 1922, menemukan penambahan 7.6 mM  $\text{NH}_4^+$  disamping 8.5 mM  $\text{NO}_3^-$ , sangat baik untuk perkencambahan dan pertumbuhan biji anggrek. Penambahan  $\text{NH}_4^+$  ternyata dibutuhkan untuk perkembangan protocorm.

✓ **Media Nitsch & Nitsch**

Media Nitsch & Nitsch, menggunakan  $\text{NO}_3^-$  dan  $\text{K}^+$  dengan kadar yang cukup tinggi untuk mengkulturkan jaringan tanaman artichoke Jerussalem. Penambahan ammonium khlorida sebanyak 0.1 mM, menghasilkan pertumbuhan jaringan yang menurun. Mereka mengambil kesimpulan, bahwa  $\text{NH}_4^+$  sangat menunjang pertumbuhan kalus tembakau.

✓ **Media Gamborg B5**

Media Gamborg B5 (media B5) pertama kali dikembangkan untuk kultur kalus kedelai dengan konsentrasi nitrat dan amonium lebih rendah dibandingkan media MS. Untuk selanjutnya media B5 dikembangkan untuk kultur kalus dan suspensi, serta sangat baik sebagai media dasar untuk meregenerasi seluruh bagian tanaman.. Pada masa ini media B5 juga digunakan untuk kultur-kultur lain. Media ini dikembangkan dari komposisi PRL-4, media ini menggunakan konsentrasi  $\text{NH}_4^+$  yang rendah, karena konsentrasi yang lebih tinggi dari 2 mM menghambat pertumbuhan sel kedelai. Fosfat yang diberikan setelah 1 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  antara 1-4 mM, sedangkan  $\text{Mg}^{2+}$  antara 0.5-3 mM.

✓ **Media Schenk & Hildebrant**

Media Schenk & Hildebrant (SH) merupakan media yang juga cukup terkenal, untuk kultur kalus tanaman monokotil dan dikotil. Konsentrasi ion-ion dalam komposisi media SH sangat mirip dengan komposisi pada media Gamborg dengan perbedaan kecil yaitu level  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{PO}_4^{3-}$  yang lebih tinggi. Schenk &



Hildebrant mempelajari pertumbuhan jaringan dari 37 jenis tanaman dalam media SH dan mendapatkan bahwa: 32 % dari spesies yang dicobakan, tumbuh dengan sangat baik, 19% baik, 30% sedang, 14% kurang baik, dan 5% buruk pertumbuhannya. Tetapi karena zat tumbuh yang diberikan pada tiap jenis tanaman tersebut berbeda. Media SH ini cukup luas penggunaannya, terutama untuk tanaman legume.

✓ **Media WPM (*Woody Plant Medium*)**

Media WPM (*Woody Plant Medium*) yang dikembangkan oleh Lioyd & Mc Coen pada tahun 1981, merupakan media dengan konsentrasi ion yang lebih rendah dari media MS. Media diperuntukkan khusus tanaman berkayu, dan dikembangkan oleh ahli lain, tetapi sulfat yang digunakan lebih tinggi dari sulfat pada media WPM. Saat ini WPM banyak digunakan untuk perbanyakan tanaman hias berperawakan perdu dan pohon-pohon. Pada umumnya media kultur jaringan dibedakan menjadi media dasar dan media perlakuan. Resep media dasar adalah resep kombinasi zat yang mengandung hara esensial (makro dan mikro), sumber energi dan vitamin. Dalam teknik kultur jaringan dikenal puluhan macam media dasar. Penamaan resep media dasar pada umumnya diambil dari nama penemunya atau peneliti yang menggunakan pertama kali dalam kultur khusus dan memperoleh suatu hasil yang penting artinya.

### **LATIHAN SOAL**

Berikut ini merupakan jenis tanaman yang akan diperbanyak dengan menggunakan kultur jaringan dengan berbagai tujuan.

1. Kentang (*Solanum tuberosum*) merupakan tanaman sayur maupun sumber karbohidrat. Hingga saat ini serangan dari jamur terutama *Phytophthora* mengakibatkan merosotnya produksi kentang. Untuk mendapatkan bibit unggul dapat dilakukan dengan mikropropagasi sederhana.
2. Anggrek bulan (*Phalaenopsis* sp.) merupakan tanaman hias yang menghasilkan bunga yang menarik, sehingga memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Pembiakan secara biji secara alami sangat sulit karena kotiledonnya sangat kecil sehingga memerlukan simbiosis dengan jamur. Untuk

mendapatkan bibit yang seragam dalam waktu yang relatif singkat dilakukan kultur jaringan.

3. *Taxus* sp. merupakan tanaman yang menghasilkan senyawa taxol yang bermanfaat sebagai obat anti kanker khususnya kanker payudara. Di alam tumbuhan tersebut sangat lambat pertumbuhannya dan sulit bereproduksi secara alami. Untuk menghasilkan taxol maka kultur sel merupakan alternatif yang potensial.
4. Hau hapur (*Dryobalanops* sp.) merupakan tanaman penghasil kayu yang sangat bagus dan merupakan tanaman endemik khususnya pesisir Barat Sumatera terutama Sumatera Utara. Ilegal logging secara besar-besaran di Sumatra Utara pada tahun 1980-an mengakibatkan kelangkaan tanaman tersebut, sehingga terdaftar dalam *Cites* II IUCN. Untuk mendapatkan bibit di alam sangat sulit, maka alternatif yang baik dapat dilakukan dengan kultur jaringan.

Jelaskan media yang cocok digunakan untuk beberapa kasus tersebut di atas dan berikan alasannya.

## BAB IV

### TAHAPAN DALAM KULTUR JARINGAN

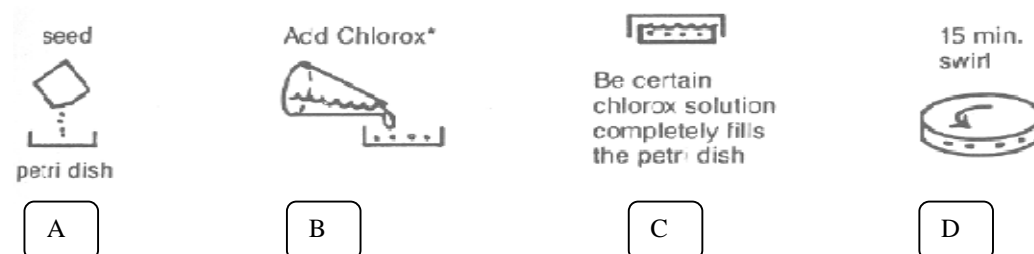
#### Capaian Pembelajaran:

3. Mahasiswa dapat menjelaskan tahapan yang dilakukan dalam pengerjaan kultur jaringan.
4. Mahasiswa dapat mengidentifikasi titik kritis untuk keberhasilan kultur jaringan

Tahapan yang dilakukan dalam pelaksanaan kultur jaringan tanaman bervariasi sesuai dengan tujuan penelitian atau pengerjaan. Secara umum tahapan kultur jaringan sebagai berikut:

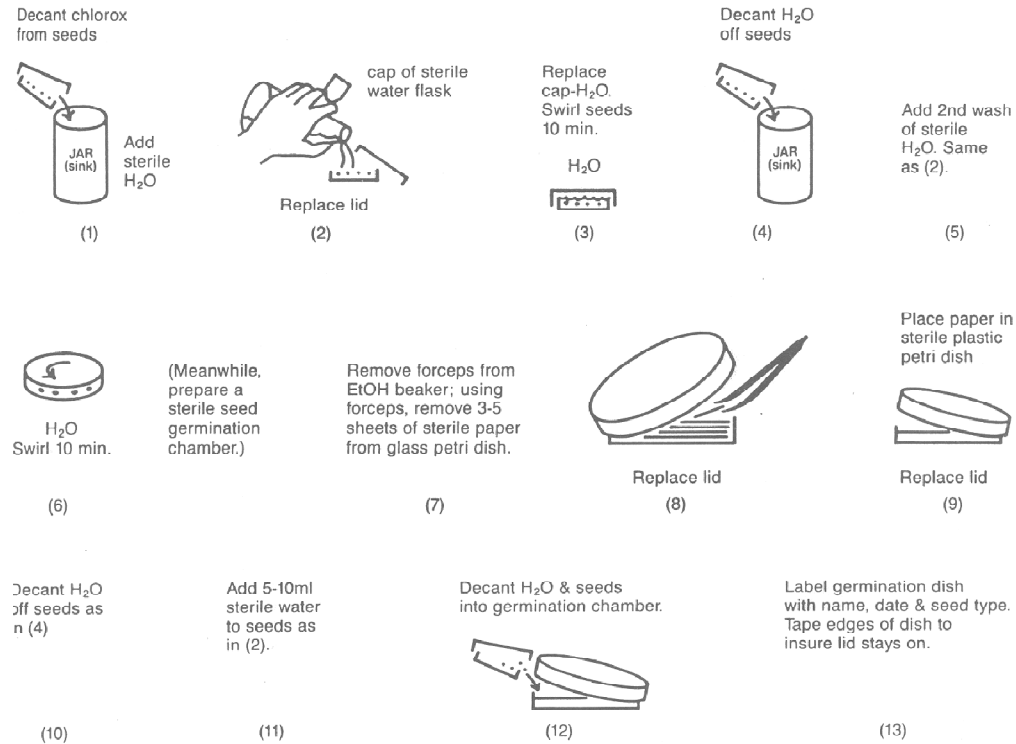
#### A. Tahap Persiapan

Tahap persiapan dilakukan untuk memastikan keseluruhan peralatan dan bahan yang akan digunakan tersedia. Alat dan bahan yang akan digunakan terlebih dahulu dibersihkan kemudian disterilisasi. Sterilisasi merupakan tahapan yang sangat kritis dalam pelaksanaan kultur jaringan. Hal ini dilakukan untuk memastikan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan ada dalam keadaan steril sesuai dengan prinsip kultur jaringan merupakan kultur yang bersifat aseptik. Sterilisasi meliputi beberapa hal antara lain sterilisasi alat, bahan maupun media. Semua peralatan baik alat pembuatan media (botol kultur) dan alat inokulasi eksplan (cawan petri, *scalpel blade*, gunting eksplan, pinset, kertas saring dan tissue) dilakukan sterilisasi. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 20 menit.



Gambar 1. Tahapan sterilisasi eksplant (biji). A) biji dituang ke dalam cawan petri; B) Cloroks (antiseptik) ditambah ke cawan petri; C) Seluruh permukaan petri diisi

dengan cloroks; D) dilakukan pengadukan supaya semua permukaan biji terendam dengan kloroks



Gambar 2. Tahapan persiapan eksplan (Mineo 1990)

## B. Tahap Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam kultur jaringan bervariasi sesuai dengan tujuan penelitian. Media yang umum digunakan antara lain medium Murashige- Skoog (MS), medium Vacint Went (VW), media Gamborg, medium B5 dan medium White. Setiap media memiliki komposisi yang berbeda, namun secara umum mengandung unsur makronutrien, mikronutrien, unsur tambahan yang dibutuhkan tumbuhan. Medium MS merupakan medium yang paling memiliki senyawa makro dan mikronutrien yang paling lengkap sehingga paling sering digunakan untuk mikropropagasi berbagai jenis tumbuhan.

Sediaan medium kultur jaringan saat ini bervariasi ada yang berbentuk instant (tinggal tuang) namun ada dalam bentuk senyawa tunggal sehingga penting dibuat larutan stok. Berikut ini merupakan contoh pembuatan medium MS baik dari

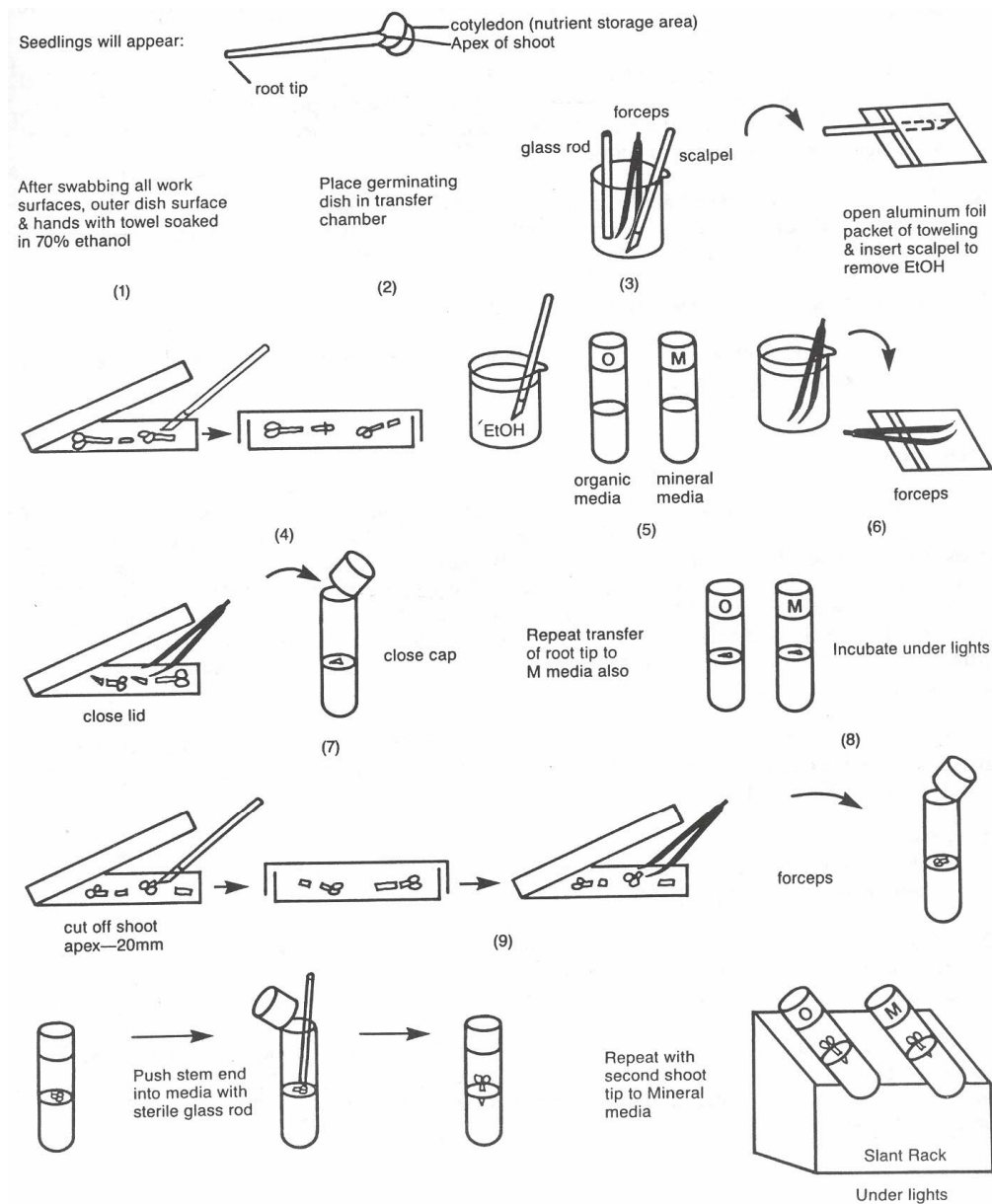
medium instant. Medium MS instant untuk satu liter dimasukkan ke dalam 1000 mL akuades dan diaduk hingga larut sempurna. PH medium diatur 5,8 – 6,0 dengan menambahkan NaOH atau HCl. Bila yang akan dibuat media padat maka pada medium tersebut ditambahkan agar-agar sebanyak 7-8 gr lalu dipanaskan hingga mendidih dan agar terlarut sempurna. Media yang telah terbentuk dimasukkan ke dalam botol kultur sebanyak 15-20 mL perbotol lalu ditutup dengan aluminium foil. Medium dalam botol kultur disetir dengan menggunakan autoklav autoklav dengan suhu 121°C pada tekanan 15 atm Psi selama 15 menit.

### C. Tahap Inokulasi Eksplan

Eksplan merupakan bagian-bagian tanaman (daun, biji, akar, kotiledon atau bagian lainnya) yang akan diinokulasikan dalam medium in vitro. Sebelum eksplan diinokulasikan terlebih dahulu disterilkan. Proses sterilisasi eksplan berbeda dengan sterilisasi medium maupun alat. Sterilisasi eksplan dilakukan secara bertahap. Secara umum sterilisasi eksplan diawali dengan pencucian dengan menggunakan air mengalir kemudian disterilisasi dengan menggunakan zat-zat yang bersifat antiseptik seperti bayclin, alkohol, antibiotik atau zat lain yang memiliki zat aktif. Berikut ini contoh merupakan sterilisasi eksplan berupa daun muda tembakau *Nicotiana tabacum*. Daun tembakau disterilisasi dengan cara dicelupkan pada etanol 70% selama 25 detik kemudian dicuci dengan aquades steril, selanjutnya direndam dalam larutan sodium hipoklorit 1% selama 10 menit, lalu dicuci dengan aquades steril secara bertingkat sebanyak 3 sampai 4 kali. Selanjutnya dicuci dengan aquades steril. Sodium hipoklorit yang digunakan adalah Bayclin™ (konsentrasi Natrium hipoklorid 5,25 %). Sterilisasi eksplan dilakukan di dalam *laminar air flow* dengan kondisi aseptik. Selanjutnya eksplan diambil dengan pinset dan ditiriskan pada kertas saring steril.

Setelah diperoleh eksplan yang telah steril maka dilakukan inokulasi eksplan. Inokulasi merupakan proses penanaman eksplan pada media. Proses inokulasi dilakukan di *laminar air flow* dengan kondisi aseptik. Alat-alat inokulasi ditata di dalam *laminar air flow*. Setiap alat tersebut dicelupkan ke dalam alkohol 95% dan dilewatkan di atas nyala api bunsen selama 1-2 menit. Daun tembakau yang telah

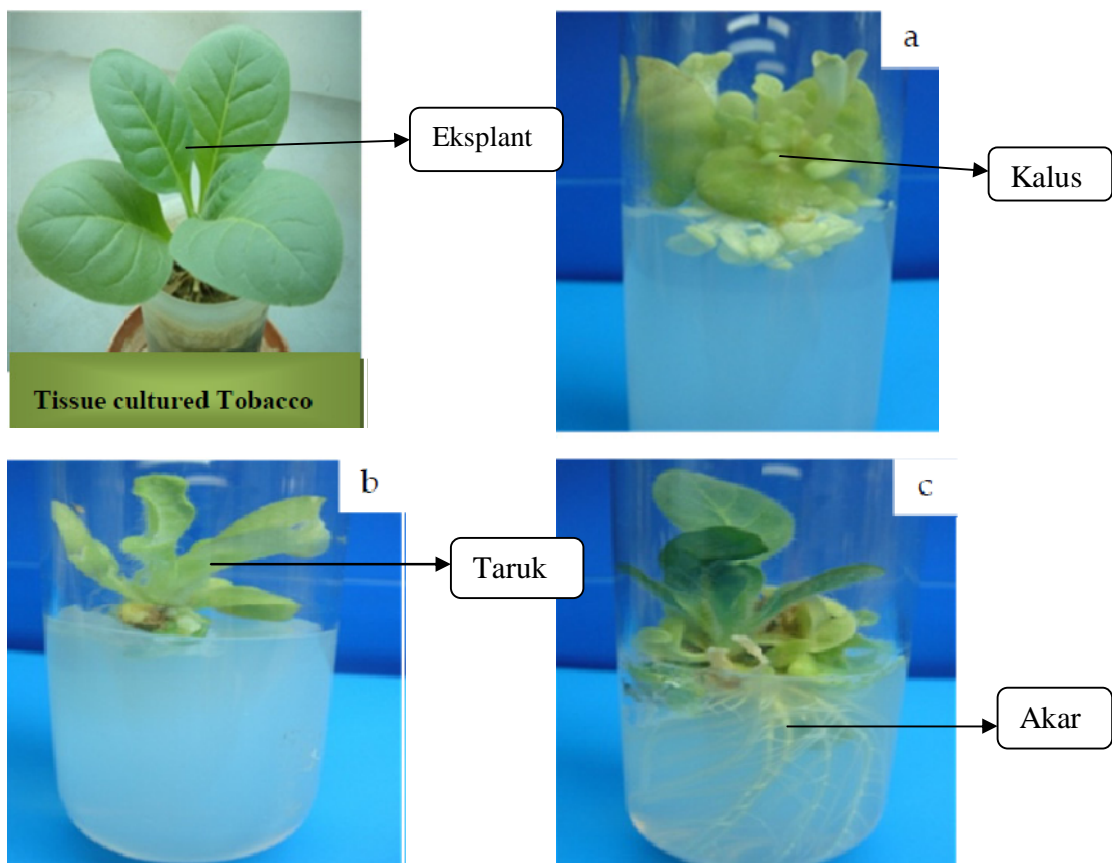
steril dipotong  $\pm 1 \times 1$  cm dan diinokulasikan ke dalam botol kultur yang telah berisi  $\pm 20$  ml media MS dengan posisi bagian abaksial menyentuh medium.



Gambar 3. Tahapan inokulasi eksplan pada media (Mineo 1990).

Berikut ini merupakan contoh dari perbanyakan tembakau dengan menggunakan kultur jaringan. Untuk induksi kalus digunakan medium yang digunakan

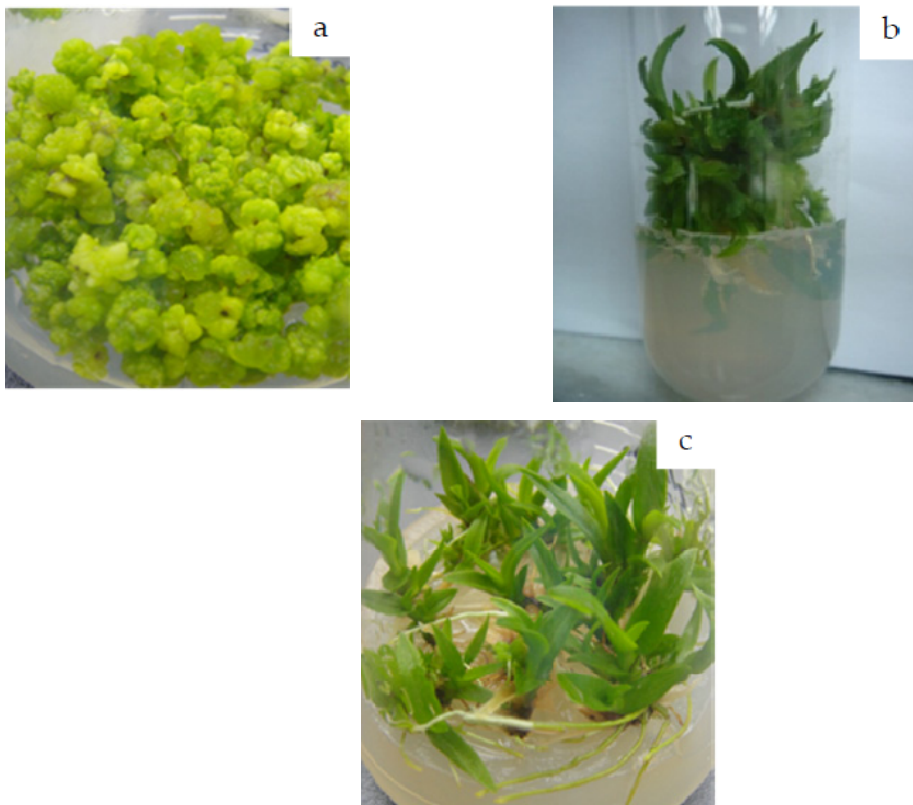
merupakan medium MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) berupa 1,0 ppm 2,4-D (2,4-diclorophenoxi acetat acid). Untuk menginduksi taruk (*shoot*) kalus dipihdahkan ke medium yang sama dengan menambahkan 0,5 ppm BAP (*Benzil Amino Purine*) pada medium. Untuk menginduksi akar, shoot yang telah terbentuk dipindahkan ke medium yang mengandung 2,0 ppm IBA (Indole Butirat Acid) dan 2,0 ppm NAA (*Naftalene Acetat Acid*) (Gambar 4).



Gambar 4. Kultur jaringan *Nicotiana tabacum* (a) Kalus (b) Pembentukan taruk (*shoot*) (c) Pembentukan akar (Hassain dkk.2012)

Kultur jaringan juga dapat dilakukan untuk membantu tumbuhan yang sulit dibiakkan secara alami seperti Anggrek. Anggrek merupakan tanaman hias yang memiliki nilai ekonomi yang sangat besar. Beberapa spesies tersebut antara lain: *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, dan *Cattelya*. Berikut ini merupakan mikropopagasi

Phalaenopsis dengan menggunakan kultur jaringan. Regenerasi kalus dibiakkan dalam medium MS dengan penambahan 3,0% sukrosa, dengan penambahan berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D. Kalus yang dikultur mengalami poliferasi setelah 30 hari di kultur. Kalus yang paling baik terbentuk pada penambahan 0,5 ppm BAP. Kalus yang terbentuk berwarna hijau dan kompak. Untuk induksi taruk kalus dipindahkan pada medium yang mengandung BAP dan GA3 (*Giberelin Acid*). Taruk yang paling baik terdapat pada medium dengan penambahan 1,0 ppm GA3. Untuk menginduksi akar, taruk yang telah terbentuk dipindahkan ke medium yang mengandung 2,0 ppm IBA.



Gambar 5. Mikropropagasi Anggrek (a) kultur kalus (b) pembentukan taruk (c) pembentukan akat pada plantlet

### LATIHAN SOAL



Pegagan atau yang dikenal dengan *Centella asiatica* merupakan salah satu jenis tumbuhan obat yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat lokal Indonesia untuk mengatasi berbagai penyakit dan merupakan bahan baku untuk berbagai jenis jamu tradisional. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa asiatikosida merupakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan pegagan secara alami. Selain dihasilkan oleh tanaman secara *in-vivo* ternyata dari berbagai laporan penelitian senyawa tersebut dapat dihasilkan melalui kultur *in-vitro* seperti kultur kalus.

1. Jelaskan langkah-langkah yang harus dilakukan dalam membuat kultur kalus kultur jaringan meliputi:
  - a. Tahap persiapan (pemilihan eksplan dan alasannya).
  - b. Tahap pembuatan media (pemilihan media dan jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan).
  - c. Tahap inokulasi eksplan dan subkultur.

## **BAB V**

### **JENIS JENIS KULTUR JARINGAN**

#### **Capaian Pembelajaran:**

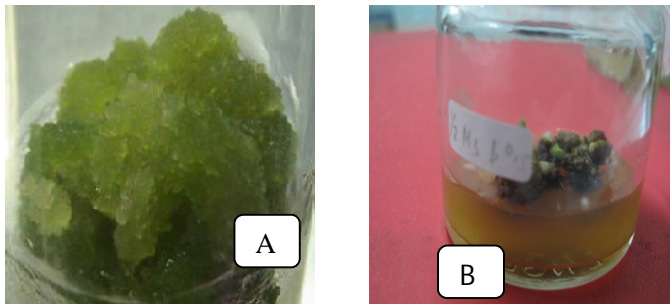
4. Mahasiswa dapat menjelaskan perbedaan proses pelaksanaan kultur kalus, sel dan organ.
5. Mahasiswa dapat menjelaskan perbedaan embriogenesis somatis secara langsung dan tidak langsung.
6. Mahasiswa dapat merancang percobaan untuk pembuatan kultur kalus.

#### **A. Kultur kalus**

Kalus merupakan massa sel yang belum terdiffrensiasi. Pada kultur in vitro kalus memiliki kemampuan untuk membelah secara terus menerus. Kalus dapat diinduksi dari berbagai organ tanaman yang dijadikan sebagai eksplan (daun, batang maupun tunas). Pembentukan kalus dalam kultur jaringan dipengaruhi oleh konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan. Jika konsentrasi auksin lebih besar daripada sitokinin maka kalus akan terbentuk, sedangkan jika konsentrasi sitokinin yang lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi auksin maka yang terbentuk bukanlah kalus, melainkan shoot.

Pada *Azadirachta indica* kalus diinduksi dari potongan eksplan daun majemuk kedua dan ketiga. Pada tanaman tersebut kalus terbentuk pada medium Murashige-Skoog dengan penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) dengan komposisi 0,5; 5,0; 7,5  $\mu$ M asam 2,4-diklorofenoksi asetat (2,4-D) yang dikombinasikan dengan 0,1; 1,0; 5,0  $\mu$ M benzilaminopurin (BAP) (Zakhiah dkk. 2003).

Induksi kalus dalam teknik kultur jaringan tanaman diperlukan untuk memunculkan keragaman sel somatik di dalam kultur in vitro dan meregenerasikan sel tersebut menjadi embrio somatik.



Gambar 1. Struktur kalus a. meremah (*friable*) dan B. kalus kompak

*Gonystylus* spp. kalus di induksi dengan menggunakan 2,4-D (3.0 – 5.0 mg/l). Jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan akan memngaruhi struktur kalus yang terbentuk. Penambahan 2,4 D cenderung menghasilkan kalus yang meremah (*friabel*) sedangkan penambahan BAP dan NAA akan membentuk kalus yang kompak dan padat (Silalahi 2010). Yelnititi dan Komar (2010) menyatakan bahwa pada *Gonystylus* spp bahwa upaya mendapatkan kalus friabel dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi 2,4-D menjadi 6.0 mg/l dan dikombinasikan dengan thidiazuron (1.0 – 2.0 mg/l) dan atau biotin (1.0 – 2.0 mg/l).

## B. Induksi Kalus pada Berbagai jenis Tanaman

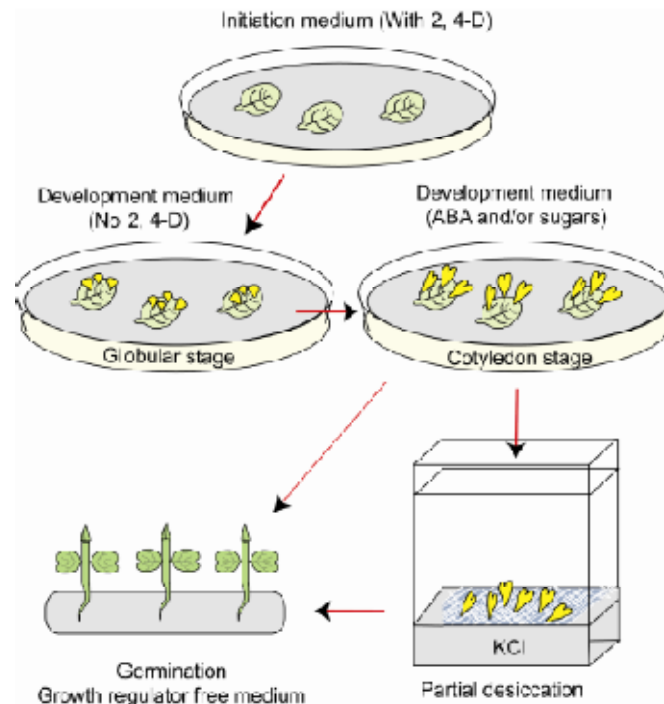
Induksi kalus pada *Gonystylus* spp. berikut ini disarikan dari penelitian Yelnititi dan Komar (2010). Teknik kultur jaringan khususnya kultur kalus merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk mendapatkan bibit tanaman khususnya tumbuhan yang terancam punah atau tumbuhan yang susah dibiakkan secara alami. Kalus dirancang membentuk individu baru melalui embriogenesis somatis. Embriogenesis somatis merupakan pembentukan embrio tanaman yang dirangsang dari kalus atau sel-sel yang belum terdiffensiasi.

Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.) merupakan salah satu dari beberapa jenis pohon yang penting dan mempunyai nilai ekonomi tinggi. Jenis ini merupakan salah satu jenis pohon penghasil kayu yang paling banyak dieksploitasi dan paling diminati untuk diperdagangkan dari 10 jenis yang ada di Indonesia. Menurut CITES (*Convention on International Trade in Endangerred Species of Wild*

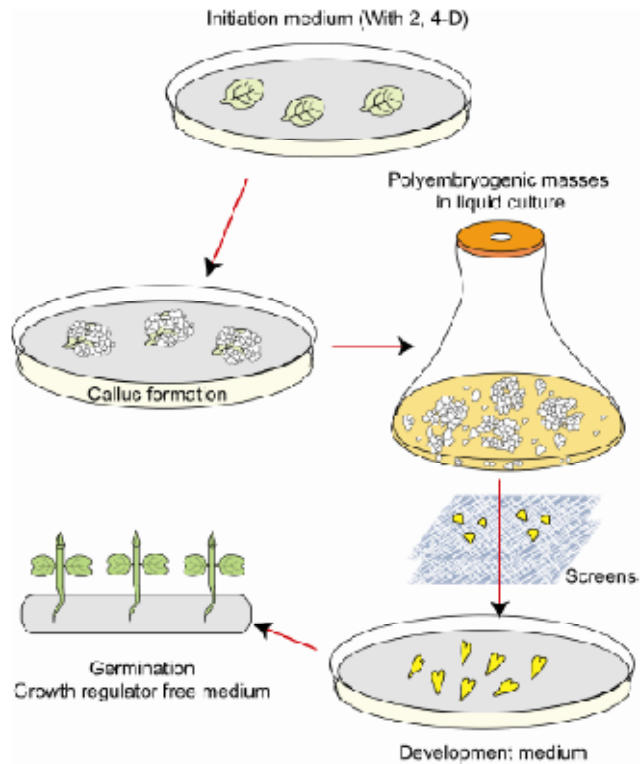
*Fauna dan Flora*) jenis ramin dimasukkan ke dalam appendix III dan meningkat menjadi appendix II pada tahun 2004.

Ramin dapat diperbanyak secara generatif dengan menggunakan biji tetapi benihnya sulit ditemukan, selain itu ramin berbuah sekali dalam 2 - 4 tahun. Hal tersebut menyebabkan sediaan bibit ramin secara konvensional dalam jumlah banyak sangat sulit dilakukan. Embriogenesis merupakan salah satu teknik yang menguntungkan untuk propagasi vegetatif massal dari spesies yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Embriogenesis somatik dapat terjadi secara langsung maupun secara tidak langsung. Embrio somatik yang dihasilkan memiliki sifat klonal yang sama seperti induknya dan juga mempunyai sifat juvenile seperti embrio yang berasal dari biji. Propagasi tanaman melalui embriogenesis somatik terdiri dari beberapa tahap yaitu inisiasi kalus dan kalus embriogenik, perbanyakan kalus embriogenik, pendewasaan embrio somatik, penuaan embrio somatik dan perkecambahan. Hal tersebut menunjukkan bahwa keberhasilan pembentukan kalus merupakan tahap awal untuk mendapatkan embrio dari sel-sel somatis. Embriogenesis somatis dibedakan menjadi 2 yaitu embriogenesis somatis secara langsung dan embriogenesis somatis secara tidak langsung (Gambar 3).

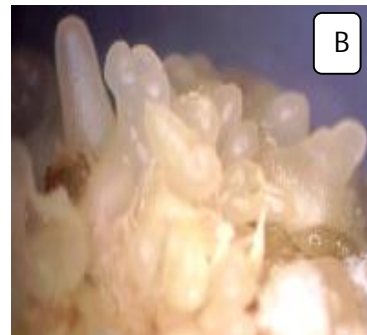
Embriogenesis secara direct (langsung) melalui tahapan: explant → callus → meristemoid → primordium. Embriogenesis somatis indirect (secara tidak langsung) melalui tahapan explant → callus embryogenic → maturation → germination.

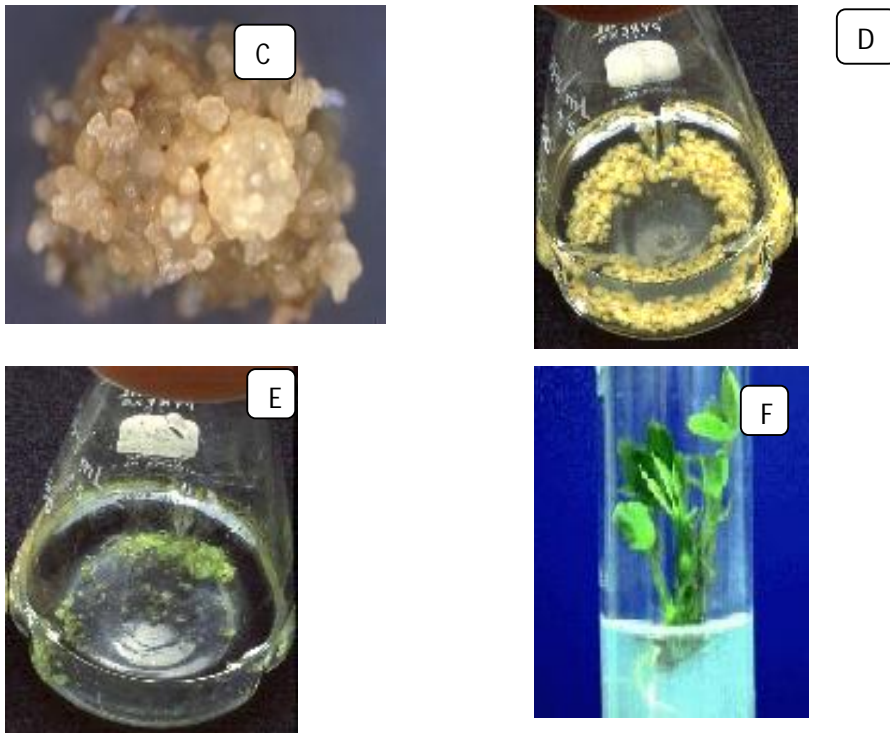


Gambar 2. Embriogenesis secara langsung.



Gambar 3. Embriogenesis secara tidak langsung.





Gambar 3a. embriogenesis secara langsung pada kacang. A. sumber eksplan; b. pembentukan fase heart c. screen d.e. medium perbanyak f. germinasi

Embriogenesis somatis merupakan pembentukan embrio dari sel-sel somatis. Embriogenesis somatis dapat dilakukan melalui kultur jaringan, namun embrio yang terbentuk tanpa fase globuler tetapi langsung fase heart. Embriogenesis somatis memiliki tahapan yang sedikit berbeda dari embriogenesis zigotik yang memiliki tahapan: fase globular, diikuti dengan fase heart, kemudian torpedo dan selanjutnya terbentuk kotiledon, kemudian geminasi.

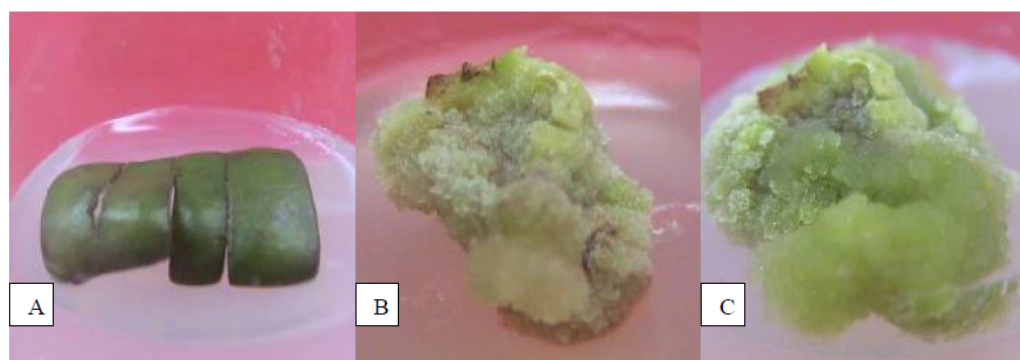
Sebagai sumber eksplan digunakan daun dari anakan ramin. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan zat yang mengandung senyawa aktif  $\text{HgCl}_2$ . Untuk media kultur digunakan media Murashige-Skoog dengan penambahan 2,4-D 2,4-D dengan konsentrasi (3.0-5.0 mg/l) dan thidiazuron dengan konsentrasi (1.0-1.5 mg/l). Eksplan yang telah steril dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm kemudian ditanam pada mediaum MS yang telah disterilkan terlebih dahulu.

Untuk meningkatkan massa sel kalus maka dilakukan subkultur (pemindahan ke medium yang sama) namun untuk merangsang pertumbuhan lebih cepat konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan ditingkatkan khususnya 2,4-D.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi kalus dipengaruhi oleh konsentrasi 2,4-D yang digunakan. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang digunakan induksi kalus semakin cepat terjadi. Tabel 1 menunjukkan pembentukan kalus pada ramin dengan penambahan berbagai konsentrasi 2,4-D dan TDZ.

Tabel 1. Kalus ramin dari perlakuan 2,4-D dan kombinasi dengan thidiazuron umur 8 minggu

Perlakuan (mg/l)	Penampakan visual kalus
2,4-D 5.0	Kompak, hijau, pertumbuhan lambat
2,4-D 5.0 + thi 1.0	Semi friabel, putih kekuningan, pertumbuhan cepat
2,4-D 5.0 + thi 1.5	Semi friabel, putih kekuningan, pertumbuhan cepat
2,4-D 5.0 + thi 2.0	Semi friabel, putih kekuningan, pertumbuhan cepat



Gambar 4. A. Eksplan potongan daun; B dan C. Kalus dari perlakuan 2,4-D.

#### ✓ **Pembentukan kalus pada *Centella asiatica***

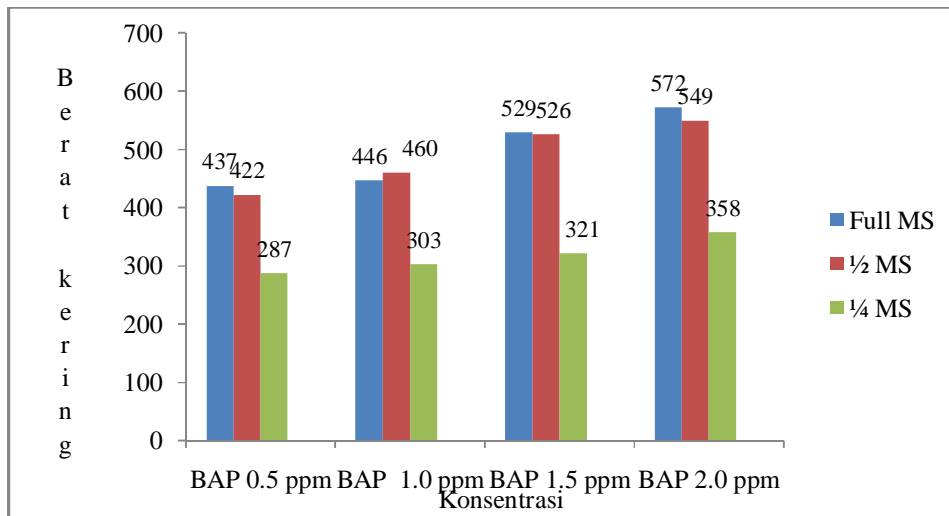
Tulisan ini disarikan dari Silalahi (2015). *Centella asiatica* merupakan salah satu jenis tumbuhan obat yang dimanfaatkan oleh masyarakat lokal di Asia seperti Indonesia, India, dan Malaysia. Hingga tahun 1992, di Indonesia ditemukan sebanyak 59 jenis jamu yang menggunakan pegagan sebagai bahan baku, dengan persentase  $\pm 15-25\%$ . Pemanfaatan *C. asiatica* sebagai bahan obat sebagian besar masih diekstrak langsung dari alam. Hal tersebut mengakibatkan pasokan, kualitasnya belum dapat dijamin sepenuhnya.



Beberapa senyawa kimia yang telah diekstrak dan diidentifikasi dari pegagan antara lain: asiatikosida, madekasida, asam asiatik, terpenoid, maupun minyak atsiri. Kandungan senyawa aktif dari *Centella asiatica* yang di panen dari dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti cuaca, ketinggian dan faktor lingkungan lainnya. Untuk mengatasi hal tersebut kultur jaringan khususnya kultur kalus maupun kultur sel merupakan alternatif yang potensial. Senyawa tersebut secara alami. Keuntungan teknik kultur *in-vitro* dalam produksi metabolit sekunder dibandingkan dengan cara konvensional, antara lain dapat menghasilkan senyawa kimia dalam waktu relatif singkat; senyawa kimia dihasilkan dari kondisi yang terkontrol serta tidak tergantung kondisi geografis, iklim, dan musim; produksi senyawa metabolit sekundernya dapat ditingkatkan dengan pengaturan lingkungan sekitarnya pengaturan zat pengatur tumbuh, penambahan elisitor, penambahan prekursor, amobilisasi, atau modifikasi media.

Sebagai sumber eksplan dalam penelitian ini merupakan daun muda dari *Centella asiatica*. Eksplan disterilisasi dengan menggunakan bayclin yang mengandung zat aktif  $\text{HgCl}_2$  0,1%, kemudian dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm. Media untuk pembiakan dilakukan modifikasi yaitu medium padat Murashige-Skoog dengan komposisi full MS, media  $\frac{1}{2}$  MS, dan media  $\frac{1}{4}$  MS. Untuk merangsang pertumbuhan kalus ditambahkan BAP 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ppm serta air kelapa sebanyak 30 % (v/v).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kalus yang terbentuk merupakan kalus kompak berwarna coklat (Gambar 1). Semua konsentrasi BAP mampu menginduksi kalus, namun kecepatan pertumbuhannya bervariasi. Konsentrasi BAP yang digunakan berbanding lurus dengan kecepatan pertumbuhan kalus (Gambar 5).



Gambar 5. Histogram hubungan konsentrasi BAP dengan berat kering kalus *C. asiatica* (mg).

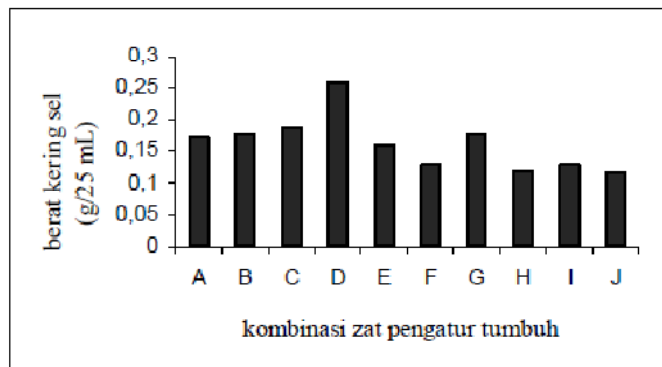
### C. Kultur Suspensi Sel

Kultur suspensi sel merupakan lanjutan dari kultur kalus. Kalus yang dapat digunakan untuk suspensi sel merupakan kalus yang meremah. Komposisi medium yang digunakan untuk kultur suspensi sel sama dengan medium untuk kultur kalus, namun dalam bentuk cair (tanpa penambahan agar). Untuk menjaga aerasi pada kultur suspensi sel maka medium harus diaduk dengan menggunakan shaker (pengaduk) yang kecepatannya antara 80-120 rpm tergantung tujuan penelitian.

Berikut ini merupakan contoh kultur suspensi sel. Zakiah dkk. (2006) telah berhasil membuat kultur suspensi sel dari *Azadirachta indica*. Nimba (*Azadirachta indica* A.Juss) adalah salah satu jenis tanaman yang menghasilkan berbagai zat aktif, salah satu bahan aktif tersebut adalah azadirachtin, suatu senyawa triterpenoid yang berguna sebagai sumber terbaik untuk biopestisida. Azadirachtin dapat digunakan sebagai biopestisida karena bersifat “*antifeedant*” (penolak makan pada serangga) dan mengganggu pertumbuhan serta reproduksi serangga. Sebelum dilakukan kultur suspensi sel terlebih dahulu diinduksi kalus meremah. Kalus diinduksi dengan medium padat MS dengan penambahan berbagai konsentrasi dengan penambahan zat pengatur tumbuh berupa 0,5µM asam 2,4-diklorofenoksi asetat (2,4-D) dan 1,0µM benzilamino purin (BAP). Setelah terbentuk kalus meremah kalus dipindahkan ke

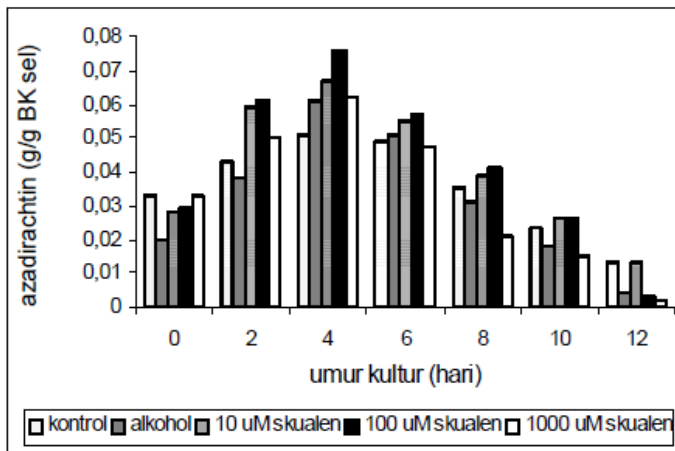
dalam medium cair MS yang ditambah ZPT berupa 0,1; 0,5; 1,0  $\mu\text{M}$  2,4-D yang dikombinasikan dengan 0,1; 0,5; 1,0  $\mu\text{M}$  BAP

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kering sel tertinggi diperoleh pada medium dengan penambahan 0,1  $\mu\text{M}$  2,4-D + 1,0  $\mu\text{M}$  yaitu  $0,259 \pm 0,087\text{g}$  (Gambar 6).



Gambar 6. Diagram batang berat kering sel kultur suspensi sel *A. indica* dalam medium cair MS + 2,4-D dan BAP; A (kontrol); B (0,1  $\mu\text{M}$  2,4-D + 0,1  $\mu\text{M}$  BAP); C (0,1  $\mu\text{M}$  2,4-D + 0,5  $\mu\text{M}$  BAP); D (0,1  $\mu\text{M}$  2,4-D + 1,0  $\mu\text{M}$  BAP); E (0,5  $\mu\text{M}$  2,4-D + 0,1  $\mu\text{M}$  BAP); F (0,5  $\mu\text{M}$  2,4-D + 0,5  $\mu\text{M}$  BAP); G (0,5  $\mu\text{M}$  2,4-D + 1,0  $\mu\text{M}$  BAP); H (1,0  $\mu\text{M}$  2,4-D + 0,1  $\mu\text{M}$  BAP); I (1,0  $\mu\text{M}$  2,4-D + 0,5  $\mu\text{M}$  BAP); J (1,0  $\mu\text{M}$  2,4-D + 1,0  $\mu\text{M}$  BAP).

Selain mampu menghasilkan massa sel yang lebih cepat ternyata kultur sel *A. indica* juga mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti yang dihasilkan tanaman induk (*in vivo*). Keuntungan lain melalui pemanfaatan kultur sel dapat memodifikasi medium sehingga kandungan metabolit sekunder target dapat ditingkatkan. Kandungan azadiraktin pada kultur suspensi sel nimba dapat ditingkatkan melalui penambahan skualen. Penambahan skualen pada konsentrasi 10, 100 dan 1000  $\mu\text{M}$  ke dalam medium kultur memperlihatkan peningkatan kandungan azadiraktin bila dibandingkan dengan kontrol (Gambar 7)



Gambar 7. Diagram batang kandungan azadirachtin di dalam sel pada kultur suspensi sel *A. indica* yang ditambah skualen 10, 100 dan 1000  $\mu\text{M}$  dibandingkan dengan kontrol

#### D. Kultur Tunas

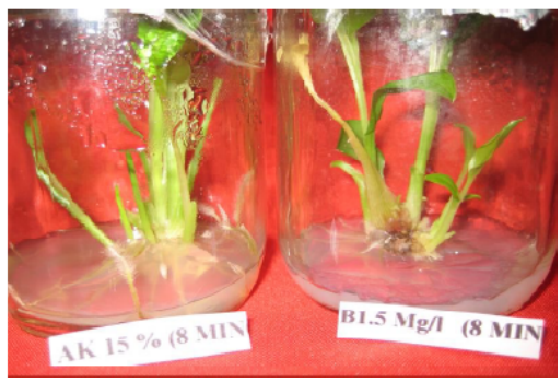
Kultur tunas salah satu cara untuk multiplikasi tanaman khususnya tanaman komersial. Beberapa tanaman yang dikembangkan dengan kultur tunas antara lain jahe (*Zingiber officinale*), temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dan kentang (*Solanum tuberosum*). Multiplikasi tunas jahe berikut disarikan dari penelitian Seswita (2010). Pada kultur jaringan tunas (shoot) merupakan cikal bakal planlet (bibit). Planlet yang dapat dijadikan harus memiliki akar. Pembentukan akar dan shoot pada kultur in vitro dapat diinduksi sekaligus atau bersamaan namun dapat juga diinduksi secara bertahap.

Pembentukan shoot dan akar dipengaruhi oleh jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan dan konsentrasi yang digunakan. Pada contoh penelitian yang dilakukan Seswita (2010) pada temulawak akar dan shoot diinduksi secara bersamaan. Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan salah satu tanaman obat unggulan yang memiliki khasiat multifungsi. Rimpang tersebut berkhasiat obat yang mampu mengobati berbagai penyakit kelainan pada hati (lever), kantong empedu dan pankreas. Sekitar 70% jamu yang beredar di pasaran mengandung temulawak dan sekitar 70% hasil produksi temulawak dari Indonesia diekspor ke luar negeri.

Meningkatnya permintaan rimpang telah mendorong meningkatnya permintaan akan bibit temulawak. Namun sampai saat ini kebutuhan yang tinggi terhadap bahan tanaman belum dapat dipenuhi sehingga diperlukan alternatif lain untuk penyediaan bahan tanaman dalam jumlah yang cukup.

Sebagai sumber eksplan dalam penelitian ini digunakan tunas temulawak varietas unggul. Tunas yang telah steril diinkubasikan dalam medium Murashige dan Skoog (MS) padat yang diberi perlakuan air kelapa pada berbagai konsentrasi yaitu : 0% (tanpa air kelapa), 5, 10, 15, 20, dan 25% (v/v). Sebagai pembanding digunakan zat pengatur tumbuh sintetis yaitu Benzyl Adenin (BA) 1,5 mg/l.

Dari penelitian ini diperoleh hasil bahwa semua konsentrasi air kelapa mampu menginduksi tunas (Gambar 5). Penggunaan konsentrasi air kelapa 15% menghasilkan jumlah tunas 3,4 tunas/2 bulan, sedangkan dengan menggunakan ZPT sintetis BA 1,5 mg/l yaitu 2,4 tunas (Tabel 1).



Gambar 8. Aplikasi air kelapa 15% (kiri) dan Benzyl Adenin 1,5 mg/l (kanan) umur 8 minggu.

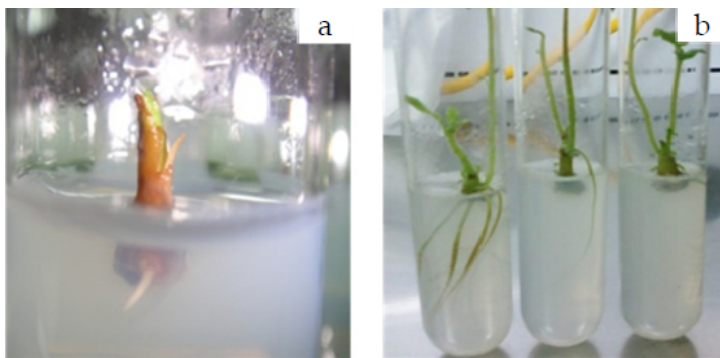
Tabel 1. Pengaruh beberapa taraf konsentrasi air kelapa terhadap pertumbuhan temulawak *in vitro*, umur 2 bulan

Perlakuan (%) <i>Treatment</i>	Jumlah tunas <i>Number of shoots</i>	Tinggi (cm) <i>Shoot length</i>	Jumlah daun <i>Number of leaves</i>	Jumlah akar <i>Number of roots</i>	Visual kultur <i>Culture performance</i>
AK 0	1,2 b	3,0 b	2,2 a	10,6 ab	Daun dan batang hijau, akar memiliki bulu akar
AK 5	1,8 b	4,1 ab	2,2 a	12,4 ab	Daun dan batang hijau, akar memiliki bulu akar
AK 10	1,4 b	3,4 ab	1,4 a	5,8 b	Daun dan batang hijau, akar memiliki bulu akar
Ak 15	3,4 a	4,0 ab	2,2 a	13,2 ab	Daun dan batang hijau, akar memiliki bulu akar
Ak 20	1,4 b	2,8 b	1,8 a	10,4 ab	Daun dan batang hijau, akar memiliki bulu akar
Ak 25	1,0 b	4,0 ab	1,4 a	8,0 b	Daun dan batang hijau, akar memiliki bulu akar
BA 1,5 mg/l	2,4 ab	6,4 a	3,0 a	17,8 a	Daun dan batang hijau, akar memiliki bulu akar
KK CV (%)	26,5	10,5	22,0	7,9	

Keterangan : AK (air kelapa), BA (Benzyl Adenin)

Note : AK (coconut water), BA (Benzyl Adenin)

Pembentukan planlet pada kentang yang dilaporkan oleh Hassain dkk (2010) dilakukan secara bertahap. Mata tunas kentang diinduksi membentuk shoot dengan penambahan BAP dan GA3, sedangkan untuk menginduksi akar ditambahkan IBA dan NAA. Mata tunas kentang (*Solanum tuberosum*) yang dikultur dalam mdium MS dengan penambahan 0.5 mg/l BAP dan 0.4 mg/l GA3 menghasilkan tunas paling banyak. Untuk menginduksi akar shoot dipindahkan pada medium yang mengandung NAA dan IBA. Pada konsentrasi NAA 2.0 mg/l didapatkan jumlah akar yang paling banyak.



Gambar 9. Kultur jaringan pada kentang, a. mata tunas kentang b. Induksi tunas dan akar.

### LATIHAN SOAL

Senyawa-senyawa kimia yang digunakan dalam industry farmasi sebagian besar merupakan metabolit sekunder yang berasal dari tumbuhan. Metabolit tersebut mempunyai peranan penting dalam usaha pengembangan obat-obatan. Salah satu sumber tanaman obat yang banyak digunakan adalah *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Terdapat lebih 100 senyawa alkaloid yang telah diisolasi diisolasi dari tanaman *C. roseus* diantaranya ajmalisin dan serpentin dari akar serta vinkristin dan vinblastin dari daun. Senyawa ajmalisin yang dihasilkan tanaman *C. roseus* banyak digunakan untuk mengobati penyakit gangguan sirkulasi (peredaran) darah dan hipertensi.

Kultur jaringan dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk memperoleh metabolit sekunder, karena dapat dilakukan modifikasi media, zat pengatur tumbuh,

sumber karbon untuk menghasilkan metabolit yang diinginkan. Keuntungan lain penggunaan kultur jaringan ini untuk produksi alkaloid adalah produksinya dapat diatur, kualitas dan hasil produksi lebih konsisten, biaya produksi lebih kecil, dan mengurangi penggunaan lahan.

Kultur kalus dan sel merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder termasuk ajamalisin yang dihasilkan *Cataharanthus roseus*. Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan melalui kultur kalus sangat dipengaruhi oleh media dan zat pengatur tumbuh yang digunakan. Buatlah rencana penelitian atau percobaan secara detail untuk membentuk kultur kalus dan kultur sel dari tanaman *C. roseus*.

Rencana tersebut meliputi:

1. Eksplan (sumber dan cara sterilisasi)
2. Media yang digunakan (cara pembuatan dan sterilisasi)
3. Zat pengatur tumbuh yang digunakan (jenis dan konsentrasi)
4. Penanaman (inisiasi)
5. Pemeliharaan



## **BAB VI**

### **MIKROPROPAGASI**

#### **Capaian Pembelajaran:**

5. Mahasiswa dapat menjelaskan cara perbanyak tumbuhan melalui mikropropagasi.
6. Mahasiswa dapat menjelaskan keuntungan perbanyak tumbuhan melalui mikropropagasi.

#### **A. Pendahuluan**

Mikropropagasi adalah perbanyak tanaman melalui kultur jaringan atau propagasi klonal tumbuhan secara *in vitro*. Mikropropagasi telah lama digunakan untuk perbanyak tanaman dan merupakan salah satu aplikasi kultur jaringan dalam bidang pertanian. Hal tersebut telah dinyatakan oleh Menurut Mantell dan Smith (1983) bahwa teknik kultur jaringan menjadi alternatif yang paling mungkin dikembangkan untuk memproduksi tanaman secara besar-besaran.

Mikropropagasi memiliki tahapan yang mirip dengan pengerjaan kultur jaringan lainnya seperti kultur kalus, kultur hairy root (akar berambut), maupun kultur sel. Kegiatan tersebut secara umum terdiri dari persiapan, inisiasi, multiplikasi, inisiasi shoot, inisiasi akar, dan aklimatisasi.

#### **B. Mikropropagasi**

Tahapan persiapan pada mikropropagasi mirip dengan tahap persiapan pada kultur lainnya yaitu pemilihan sumber eksplan, sterilisasi eksplan, pembuatan media, dan pemilihan zat pengatur tumbuh yang akan digunakan. Tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan merupakan tanaman yang sesuai dengan kebutuhan dan sesuai dengan kriteria yang diinginkan misalnya tanaman yang unggul seperti tahan hama, tahan kekeringan, tahan terhadap salinitas yang tinggi, berproduksi cepat, produksi banyak, buah manis, dan lain-lain. Sebagai eksplan dapat digunakan daun, tunas, kotiledon, dan biji.

Tahap inisiasi merupakan tahapan untuk menginduksi tanaman baru dari eksplan. Eksplan yang telah disterilkan ditanam pada media. Jaringan yang terbentuk (diinisiasi) dari eksplan sangat dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh yang digunakan. Tahap inisiasi kalus, shoot, dan akar dari eksplan dalam pengerjaan kultur jaringan terkadang berlangsung bersamaan. Beberapa penelitian tahap inisiasi diawali dengan pembentukan kalus namun pada penelitian yang lain langsung menginisiasi shoot.

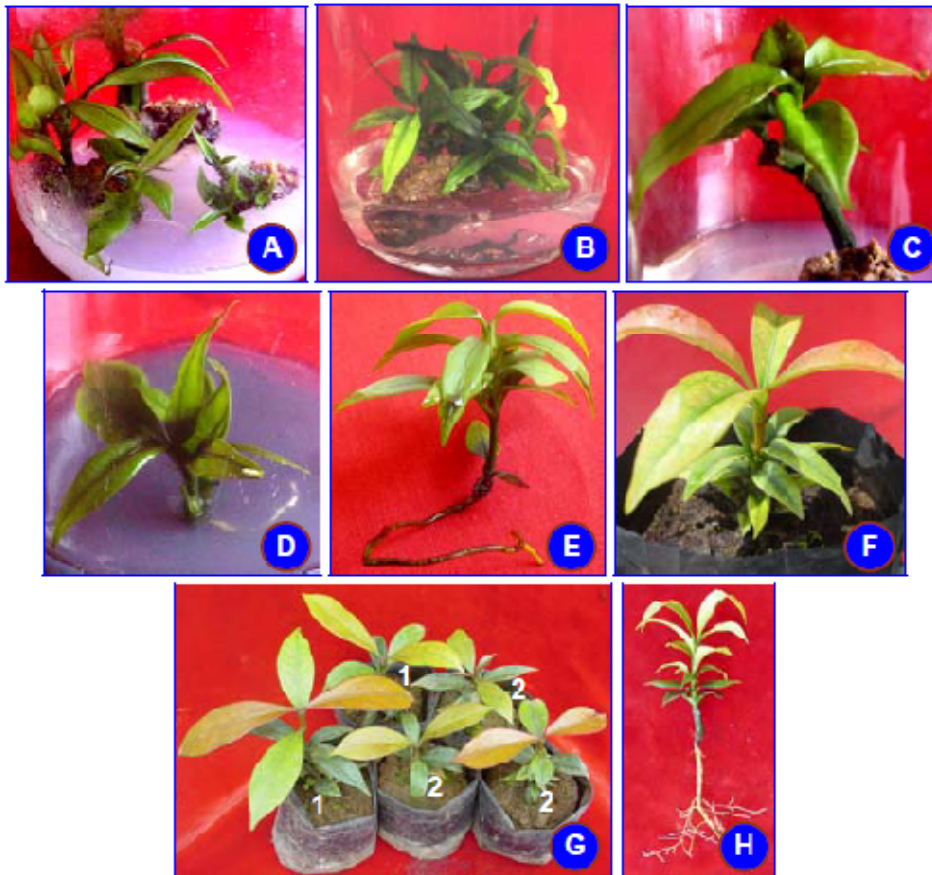
#### ✓ **Mikropropagasi Manggis**

Sebagai contoh pada manggis (*Garcinia mangostana*) pada media ditambahkan zat pengatur tumbuh BA (*Benzyl Adenin*) sehingga eksplan langsung membentuk shoot dan konsentrasi terbaik diperoleh saat penambahan pada medium WPM + BA 5 mg/l (Normah *et al.* 1992; Teo 1992), sedangkan penambahan IBA 20 mg/l akan menginduksi pengakaran. Hasil penelitian Pertamawati (1997) menunjukkan bahwa media MS + 2iP 15 ppm + IBA 0,5 ppm memberikan persentase tertinggi bagi eksplan yang berakar, sedangkan Sinaga (1999) menyatakan bahwa persentase tertinggi diperoleh dari perlakuan  $\frac{1}{2}$  MS + IBA 4 mg/l + NAA 3 mg/l.

Contoh kegiatan mikropropagasi pada manggis (*Garcinia mangostana*) yang dilakukan oleh Rostika dkk. (2005) sebagai berikut: Sebagai sumber eksplan digunakan biji manggis. Biji dibersihkan dari daging buah lalu disterilisasi dengan menggunakan alkohol 70% selama 5 menit, clorox 30% selama 10 menit, dan clorox 20% selama 5 menit.

Penelitian terdiri dari 4 tahapan yaitu (1) induksi tunas dari biji, (2) multiplikasi tunas aksilar, (3) induksi perakaran, dan (4) aklimatisasi. Untuk media induksi digunakan medium Murashige-Skoog (MS) dengan penambahan BA (1, 3, dan 5 mg/l). Setelah tunas tumbuh sekitar umur 3 bulan, sebagian eksplan disubkultur ke media multiplikasi shoot. Shoot yang sudah cukup besar disubkultur ke media perakaran. Pembentukan perakaran dilakukan dengan menggunakan dua macam media dasar (MS dan WPM) pada dua taraf formula ( $\frac{1}{4}$  dan 1 formula) dan dua taraf IBA (5 dan 10 mg/l). Planlet yang terbentuk dari percobaan perakaran diaklimatisasi dengan menggunakan dua macam media tumbuh (tanah dan tanah + kompos) pada

dua macam lingkungan tanam (rumah kaca dan ruang kultur + rumah kaca, yaitu inkubasi di ruang kultur selama dua bulan dan kemudian dipindahkan ke rumah kaca) (Gambar 1).

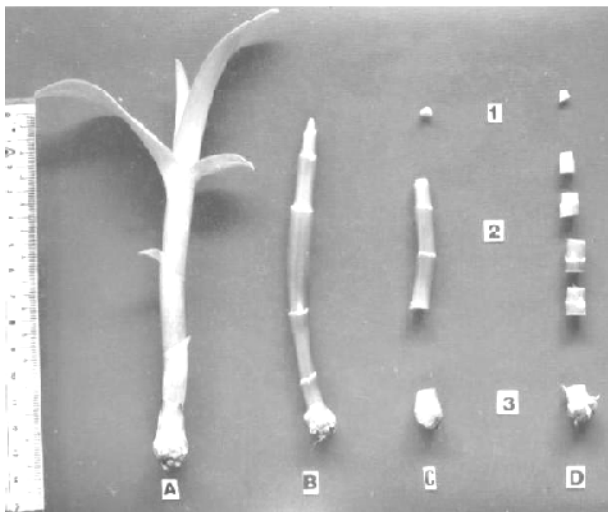


Gambar 1. Tahapan perbanyakan manggis secara kultur *in vitro*. A = tunas yang tumbuh dari empat bagian biji, B = tunas yang tumbuh dari 1/4 bagian keping biji, C = tunas aksilar yang tumbuh pada media multiplikasi tunas, D = akar yang tumbuh pada media perakaran, E = planlet yang siap diaklimatisasi, F = bibit yang tumbuh pada media aklimatisasi tanah + kompos (1 : 1), G = bibit manggis umur 4 bulan, H = penampakan akar yang terdiri dari akar primer, sekunder, dan tersier (Rostika dkk. 2006).

#### ✓ Mikropropagasi Anggrek

Tahapan mikropropagasi sedikit berbeda pada anggrek. Pada anggrek eksplan dibiakkan pada medium cair untuk membentuk protocorm like bodies. Berikut ini

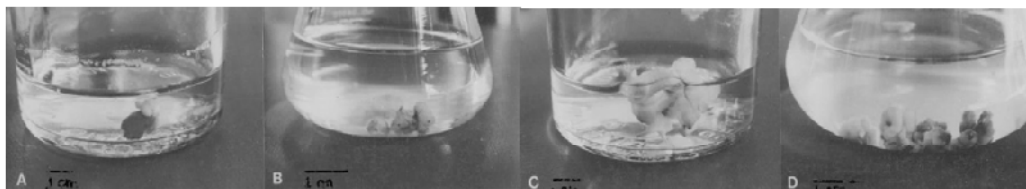
mikropropagasi yang dilakukan oleh Nugroho (2006) pada anggrek *Dendrobium phalaenopsis*. Sumber eksplan adalah tunas pucuk dan tunas aksiler yang diambil dari batang muda yang masih lunak, dengan tinggi batang sekitar 7-10 cm (Gambar 2). Media dasar dalam penelitian ini adalah media Vacin dan Went (VW) yang digunakan untuk media induksi dan multiplikasi *protocorm-like bodies* (PLB), pembentukan dan multiplikasi tunas, serta akar.



Gambar 2. Sumber eksplan. A. Batang muda yang masih diselimuti vagina dan lamina. B. Batang yang sudah dibuang lamina dan vaginanya. C. Batang muda dipotong menjadi tiga bagian besar, yaitu: 1. Tunas pucuk; 2. Tunas aksiler sepanjang batang, terletak pada ruas dalam posisi berselang-seling; 3. Tunas aksiler dekat akar. D. Eksplan yang diperoleh dari satu batang muda yaitu satu tunas pucuk, beberapa tunas aksiler sepanjang batang, dan satu tunas aksiler dekat akar.

Media yang digunakan untuk menginduksi pembentukan *protocorm-like bodies* adalah media VW berfase cair. Media induksi dan multiplikasi *protocorm-like bodies* ini dibuat bervariasi dengan penambahan zat pengatur tumbuh kinetin dan *Indole Acetic Acid* (IAA) masing-masing dengan variasi konsentrasi 0 M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M dan  $10^{-5}$  M. Media untuk pembentukan dan multiplikasi tunas, serta media perakaran digunakan media VW berfase padat. Media ini juga dibuat bervariasi dengan penambahan zat pengatur tumbuh kinetin dan IAA untuk memperoleh pertumbuhan kultur yang optimum.

Media pembentukan dan multiplikasi tunas serta media perakaran merupakan media lanjutan yang baru digunakan setelah tunas aksiler terinduksi membentuk *protocorm-like bodies*, maka konsentrasi kedua zat pengatur tumbuh yang ditambahkan pada media pembentukan dan multiplikasi tunas serta media perakaran hampir sama dengan konsentrasi kedua zat pengatur tumbuh yang ditambahkan pada media induksi yang menghasilkan kultur optimum, namun kisaran konsentrasi diberikan lebih dipersempit. Dalam hal ini zat pengatur tumbuh kinetin ditambahkan bervariasi yaitu  $5.10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5.10^{-4}$  M serta  $10^{-4}$  M, sedangkan IAA ditambahkan dengan konsentrasi  $10^{-7}$  M,  $5.10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M serta  $5.10^{-6}$  M.



Gambar 3. Pembentukan dan pertambahan jumlah *protocorm-like bodies* pada media cair VW dengan penambahan  $10^{-5}$  M kinetin dan  $5.10^{-7}$  M IAA (A = umur 8 minggu; B = umur 10 minggu; C = umur 12 minggu; D = umur 14 minggu) (Nugroho dkk.2006).

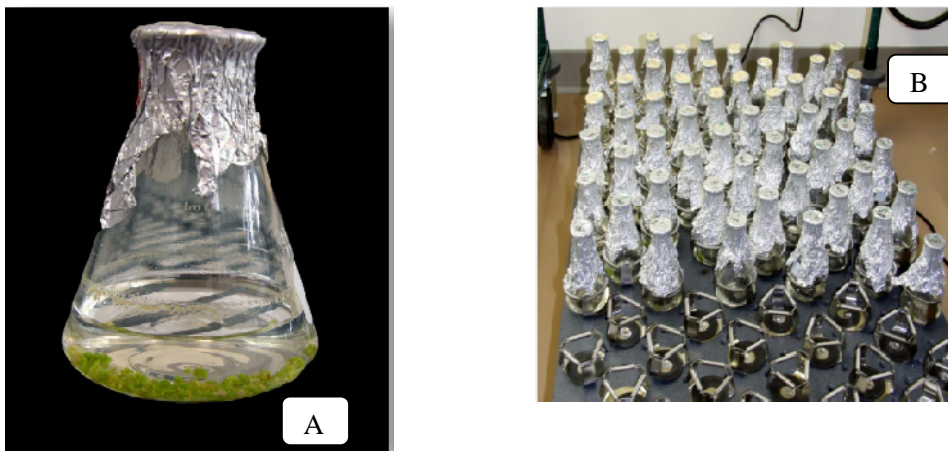


Gambar 4. Perkembangan *protocorm-like bodies* hingga menjadi tunas dengan penambahan  $10^{-4}$  M kinetin dan  $5.10^{-6}$  M IAA dengan tiga kali subkultur tanpa pemisahan tunas. (A= umur 2 minggu; B = umur 4 minggu; C = umur 6 minggu; D = umur 8 minggu; E = umur 10 minggu; F = umur 12 minggu).



Gambar 5. Pembentukan dan multiplikasi akar pada media padat VW dengan penambahan  $5.10^{-6}$  IAA dan  $10^{-4}$  M kinetin (A = umur 0 minggu; B = umur 2 minggu; C = umur 4 minggu).

Untuk pembentukan PLB pada medium cair untuk menjamin aerasi pada medium dan juga untuk memisahkan sel-sel dilakukan agitasi (pengadukan). Agitasi dilakukan dengan menggunakan shaker (pengaduk otomatis dengan kecepatan yang bervariasi antara 80-120 rpm (Gambar 6).



Gambar 6. Mikropropagasi pada anggrek B. Pembentukan *protocorm like bodies* (PLB) pada medium cair. B. Agitasi eksplan dan PLB dengan menggunakan shaker

Tahapan Mikropropagasi pada anggrek *Dendrobium*

#### 1. Induksi dan pertambahan jumlah protocorm-like bodies pada *Dendrobium*

*Protocorm-like bodies* pada penelitian Roostika dkk. (2006) baru terbentuk setelah 8-10 minggu sejak eksplan ditanam secara seri dalam media cair dengan penambahan zat pengatur tumbuh kinetin dan IAA. Diketahui pula bahwa hanya eksplan tunas aksiler ke-2 dan ke-3 yang dapat terinduksi menghasilkan *protocorm-like bodies*. Hal ini mungkin ada hubungannya dengan zat pengatur tumbuh endogen yang sangat bervariasi dalam setiap bagian tumbuhan, sehingga zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam media perlu diperhatikan.

#### 2. Perkembangan protocorm-like bodies menjadi tunas dan multiplikasi tunas.

*Protocorm-like bodies* yang terbentuk dalam media cair dapat diinduksi untuk membentuk tunas dengan memindahkan *protocorm-like bodies* ke dalam media padat VW dengan penambahan  $10^{-4}$  M kinetin dan  $5.10^{-6}$  M IAA. Ketepatan jumlah zat pengatur tumbuh yang ditambahkan sangat penting dalam organogenesis. Hal ini berkaitan dengan interaksi zat pengatur tumbuh yang diberikan dan zat pengatur tumbuh endogen dalam potongan jaringan tersebut.

### 3. Perkembangan protocorm-like bodies menjadi tunas dan multiplikasi tunas

*Protocorm-like bodies* yang terbentuk dalam media cair dapat diinduksi untuk membentuk tunas dengan memindahkan *protocorm-like bodies* ke dalam media padat VW dengan penambahan  $10^{-4}$  M kinetin dan  $5.10^{-6}$  M IAA. Ketepatan jumlah zat pengatur tumbuh yang ditambahkan sangat penting dalam organogenesis. Hal ini berkaitan dengan interaksi zat pengatur tumbuh yang diberikan dan zat pengatur tumbuh endogen dalam potongan jaringan tersebut. Untuk mempertahankan dan meningkatkan pembentukan tunas maka dilakukan sub-kultur. Sub kultur merupakan pemindahan kultur ke dalam medium baru yang komposisi sama atau berbeda. Subkultur pada anggrek *Dendrobium* dilakukan setiap 4 minggu dengan memisahkan setiap tunas yang terbentuk ke media baru yang segar. Subkultur sangat penting untuk mempertahankan dan meningkatkan kondisi pertumbuhan suatu kultur. Tunas yang tidak dipindahkan ke media baru setelah 4 minggu menunjukkan gejala penurunan jumlah tunas yang dihasilkan.

### 4. Perakaran

Setelah dilakukan multiplikasi shoot dilakukan inisiasi akar. Inisiasi akar dilakukan dengan memindahkan ke medium baru dengan komposisi zat pengatur tumbuh yang berbeda. Pada penelitian yang dilakukan Roostika dkk. (2006) pengakaran diinduksi dengan pemindahan shoot ke dalam medium yang mengandung  $5.10^{-6}$  M IAA dan  $10^{-5}$  M kinetin. Jumlah akar rata-rata yang terbentuk pada minggu kedua dan keempat masing-masing sebanyak 2,07 akar dan 4,20 akar. Terbentuknya akar pada media dengan konsentrasi auksin yang lebih tinggi daripada sitokinin.

### 5. Aklimatisasi

Tanaman hasil kultur jaringan yang telah memiliki shoot dan akar disebut dengan planlet (gambar 7). Planlet dengan ukuran tertentu siap dipindahkan ke media tanam di green house untuk aklimatisasi. Aklimatisasi adalah proses penyesuaian diri yang dialami oleh tunas hasil kultur yang baru dikeluarkan dari lingkungan kultur.



Gambar 7. Planlet anggrek A. planlet dalam botol kultur (media ditambahkan dengan arang aktif B. planlet yang telah dikeluarkan dari botol kultur dan telah dibersihkan dari agar.

Aplikasi mikropropagasi dalam bidang pertanian memiliki keuntungan diantaranya:

- ✓ Dapat diproduksi tanaman klon dalam jumlah besar dan cepat;
- ✓ dapat diperoleh bibit dalam jumlah banyak dalam waktu yang relatif singkat;
- ✓ dapat dilakukan setiap waktu, tidak tergantung musim dan iklim;
- ✓ planlet hasil kultur dapat disimpan dan dipelihara dalam ruang kultur tidak terlalu luas;
- ✓ kondisi lingkungan yang diperlukan tanaman untuk tumbuh dan berkembang dapat dijaga dan diatur;
- ✓ memungkinkan dilakukannya rekayasa genetik, isolasi sel, isolasi protoplas dan fusi protoplas untuk berbagai keperluan pemuliaan tanaman.

### **LATIHAN SOAL**

Berikut ini merupakan gambar mikropropagasi pisang (*Musa* sp.) telah dilaporkan Singh dkk. pada tahun 2011.





Tahapan mikropropagasi pada pisang mirip dengan manggis maupun anggrek, namun berbeda dalam sumber eksplan. Pemilihan eksplan sangat penting dan merupakan salah satu titik kritis dalam keberhasilan mikropropagasi. Secara teori semua sel dapat membentuk individu baru, namun setiap sel maupun jaringan tumbuhan memiliki kepekaan yang berbeda terhadap zat pengatur tumbuh sehingga sangat menentukan dalam inisiasi jaringan.

1. Jelaskan maksud dari gambar dan proses pelaksanaan a sampai f.
2. Indonesia merupakan pusat keanekaragaman pisang. Seandainya kamu akan melakukan mikropropagasi pisang. Jelaskan jenis pisang yang kamu pilih dan berikan alasannya.

## **BAB VII**

### **FUSI PROTOPLAS**

#### **Capaian Pembelajaran:**

4. Mahasiswa dapat menjelaskan proses fusi protoplast
5. Mahasiswa dapat menjelaskan fungsi enzim-enzim dalam fusi protoplast
6. Mahasiswa dapat menjelaskan aplikasi fusi protoplas dalam kehidupan manusia

#### **A. Pendahuluan**

Protoplas merupakan sel tanaman tanpa dinding sel. Secara harfiah fusi protoplas merupakan penggabungan (*fusion*) dari dua protoplas tanaman. Fusi protoplast merupakan salah satu metode persilangan atau hibridisasi tanaman dengan memanfaatkan rekayasa genetika konvensional. Penggabungan dua protoplast tanaman mengakibatkan terbentuknya sel baru yang mengandung dua sifat yang berbeda dari tetuanya. Hal tersebut mengakibatkan dihasilkannya sifat-sifat baru dari penggabungan gen-gen tanaman donor. Dengan adanya fusi protoplast dimungkinkan untuk menghasilkan sifat-sifat unggul dari tanaman.

Fusi protoplas dapat dilakukan dengan cara menggabungkan seluruh genom dari spesies yang sama (intra-spesies), atau antar spesies dari genus yang sama (interspesies), atau antar genus dari satu famili (inter-genus). Penggunaan fusi protoplas memungkinkan diperolehnya hibrida-hibrida dengan tingkat heterosigositas yang tinggi, namun tingkat keberhasilannya sangat ditentukan oleh genotipenya. Teknologi fusi protoplas juga dapat dilakukan untuk mendapatkan sifat-sifat tertentu seperti sifat ketahanan terhadap hama dan penyakit serta cekaman abiotik.

Dengan demikian, tanaman hasil fusi dapat berupa tanaman dengan sifat-sifat gabungan dari kedua tetuanya termasuk sifat-sifat yang tidak diharapkan terutama berasal dari spesies liar. Oleh karena itu, untuk menghilangkan sifat-sifat yang tidak diinginkan tersebut maka perlu dilakukan silang balik (*back cross*) dengan tetua budi daya.

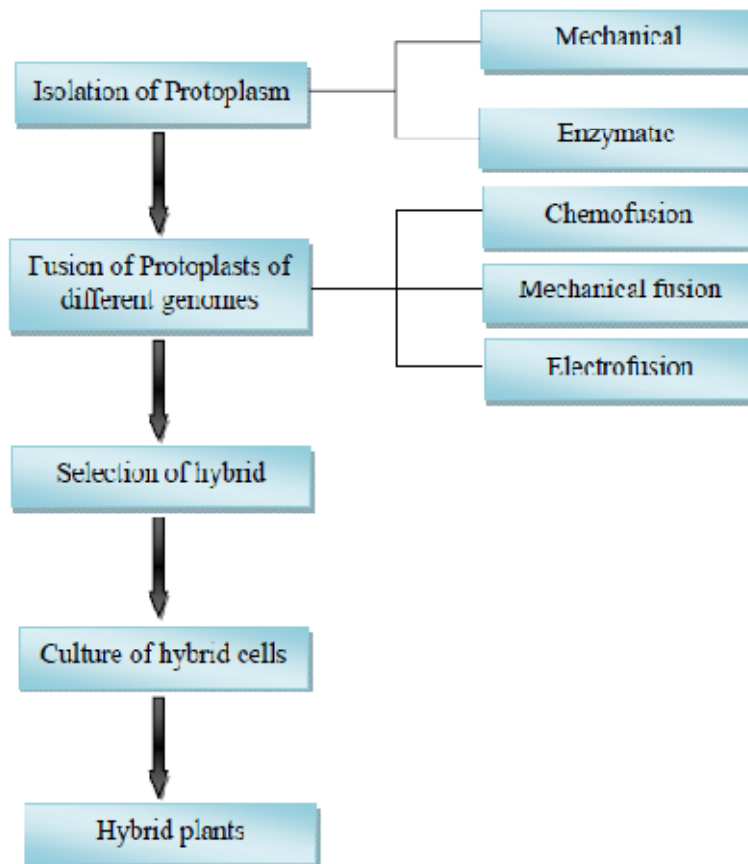
## B. Cara Pembuatan Kultur Protoplas

Untuk melakukan fusi protoplas terlebih dahulu dilakukan kultur protoplas. Isolasi protoplasma (Gambar 1) dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain: metode mekanik dan metode enzimatik (gambar 2). Isolasi protoplasma dengan menggunakan metode mekanik pertama kali oleh Klercker pada tahun 1892. Isolasi protoplasma dilakukan dengan cara mengupas dinding sel menggunakan alat bedah mikro. Metode ini telah berhasil mengisolasi protoplasma dari daun *Saintpaulia ionantha* dan dikulturkan hingga tumbuh kalus. Metode ini mudah dilakukan apabila sel memiliki vacuola yang relatif besar. Metode ini memiliki beberapa kekurangan antara lain keberhasilannya rendah; pekerjaan yang membutuhkan tenaga banyak dan membosankan; viabilitas protoplasma rendah.



Gambar 1. Protoplas yang sedang berfusi.

Metode enzimatik dilakukan dengan mengisolasi protoplas dengan menggunakan enzim. Enzim yang digunakan bervariasi jenis dan konsentrasinya tergantung kondisi fisiologis eksplan, terutama umur jaringan yang erat kaitannya dengan komposisi dinding selnya. Enzim yang digunakan untuk mengancurkan dinding sel tumbuhan umumnya ada 3 yaitu: cellulase untuk menghancurkan selulose, hemicellulase untuk menghancurkan hemiselulose, pectinase untuk menghancurkan pektin.



Gambar 2. Skema yang menggambarkan produksi tanaman hybrid melalui fusi protoplast.

### C. Isolasi Protoplas Tanaman Kacang Panjang secara Enzimatis

Isolasi protoplas berikut ini merupakan isolasi protoplas yang dilakukan oleh Imron Riyadi (2006). Teknik kultur jaringan maupun kultur protoplas biasanya dilakukan pada tanaman yang memiliki nilai ekonomi seperti kacang panjang. Kacang panjang (*Vigna sinensis* L.) merupakan tanaman sayuran penting dari golongan kacang-kacangan, karena mengandung nutrisi yang relatif lengkap dan cukup tinggi, terutama protein nabati. Teknik isolasi protoplas diperlukan dalam pemuliaan tanaman untuk menyeleksi dan merakit varietas hibrida secara lebih cepat.

Isolasi protoplas adalah teknik untuk menghasilkan protoplas yang utuh dan viabel dari jaringan tanaman hidup dengan cara menghilangkan dinding selnya.

Salah satu cara untuk memperoleh protoplas utuh adalah dengan perlakuan gelap pada suhu rendah (4°C) selama 6 jam pada saat isolasi protoplas. Penghilangan dinding sel dapat dilakukan secara mekanis maupun enzimatis. Secara enzimatis, jenis dan konsentrasi enzim yang digunakan sangat mempengaruhi perolehan protoplas. Dinding sel yang masih muda biasanya tersusun dari pektin dan selulosa. Oleh karena itu, enzim yang paling cocok digunakan adalah *pectinase* atau *macerozyme* dan *cellulase*.

Enzim *pectinase* atau *macerozyme* berfungsi untuk menghancurkan lamella tengah yang tersusun dari zat pektin, sehingga sel satu dengan sel lainnya terpisah. Fungsi enzim *cellulase* adalah menghancurkan dan melisiskan penebalan primer dari dinding sel yang tersusun dari zat selulosa. Perlakuan kedua enzim tersebut dapat dilakukan dengan dua tahap dan satu tahap.

Perlakuan dua tahap adalah dengan cara memasukkan bahan ke dalam larutan enzim secara bergantian dan berurutan dari larutan enzim *macerozyme*, kemudian dimasukkan lagi enzim *cellulase*. Perlakuan satu tahap adalah dengan cara mencampur kedua enzim tersebut dalam satu larutan untuk mengisolasi protoplas. Pengalaman dari beberapa percobaan menunjukkan bahwa mencampur kedua enzim tersebut merupakan cara yang lebih efektif untuk mengisolasi protoplas tanaman.

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini merupakan benih kacang panjang panjang. Benih dikulturkan dengan media kapas basah dalam botol. Pengkulturan benih dilakukan secara *in vitro* dengan kondisi aseptik dalam ruang terang selama 13 hari. Daun-daun ini yang digunakan sebagai donor protoplas. Sebelum dikulturkan, benih disterilisasi dengan bahan pemutih (*baycline*) konsentrasi 30%.

Ada dua media yang dibuat dan digunakan dalam proses isolasi protoplas, yaitu: *EM-medium (elution medium)* atau media elusi, yaitu media yang telah dicampur kedua enzim dengan konsentrasi yang sesuai dengan perlakuan untuk

proses isolasi protoplas dari mesofil daun kacang panjang. Komposisi medium Elusion pada tabel 1.

Tabel 1. komposisi medium isolasi protoplast (EM medium)

Nama Bahan		Konsentrasi	
Cellulase RS	2,4%	2,5%	3,0%
Macerozym R-10	0,4%	0,5%	0,6%
manitol	25mM	25 mM	25 mM
MES ( <i>Morpho-ethana Sulfoxide</i> )	1n\mM	1 mM	1 mM
pH	5,8	5,8	5,8

*CPW-medium* atau medium pencuci yang biasa disebut *PM-medium* (*purification medium*) atau media pemurni/pembersih. Media ini digunakan untuk mencuci dan memurnikan protoplas hasil isolasi dari zat enzim, sehingga protoplas dalam kondisi bersih/murni dan siap dikulturkan atau untuk proses selanjutnya, misalnya untuk fusi atau transfer organela. Macam bahan dan konsentrasi *CPW-medium* atau *PM-medium* disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi CPW medium atau media pencuci protoplast.

Nama Bahan	Konsentrasi
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 µM
KNO <sub>3</sub>	999 µM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10 µM
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	998 µM
KJ	0,96 µM
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1 µM
mannitol	600 µM

Kecambah tanaman kacang panjang yang berumur 13 hari diambil daunnya (mesofil), kemudian dikumpulkan sebagai bahan donor protoplas. Mesofil yang diperlukan 0,2 g yang sebelumnya dipotong/diiris tipis selebar +1 mm, selanjutnya dimasukkan ke dalam 2 ml larutan *EM-medium* kemudian diinkubasi dalam keadaan gelap selama 3 jam sambil dikocok di atas pengocok atau *gyotoric shaker*

berkecepatan 50 rpm. Setelah waktu inkubasi tercapai, larutan enzim beserta suspensi protoplas disaring dengan kain *Mary-Cloth* mesh 200  $\mu\text{m}$ . Suspensi protoplas yang diperoleh disentrifugasi dengan sentrifus merk *Hettich Universal* berkecepatan 1000 rpm selama 2 menit. Supernatan diambil dengan pipet dan dibuang, sedangkan endapannya ditambah larutan *CPW-Medium* 1 ml, kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Protoplas akan mengapung di permukaan larutan, kemudian diambil dengan pipet untuk ditempatkan dalam tabung tersendiri. Protoplas tersebut sudah murni, bersih dari larutan enzim dan siap dikulturkan atau difusikan. Dalam penghitungan densitas atau kerapatan rendemen protoplas hasil isolasi, suspensi protoplas tersebut diteteskan dalam *Haemocytometer* untuk dihitung densitasnya.

Perlakuan konsentrasi enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* maupun gabungan kedua enzim (interaksi) berpengaruh nyata terhadap rendemen protoplas kacang panjang hasil isolasi. Protoplas yang terisolasi umumnya berbentuk *intact* atau bulat, utuh, dan viabel dengan membran transparan dan bening, sehingga organela atau bagian dalam sel terlihat jelas. Organela yang terlihat paling jelas adalah klorofil yang menampakkan butiran warna hijau dengan jumlah relatif banyak dan berukuran relatif besar. Oleh karena itu, klorofil ini dijadikan sebagai *marker* atau penanda dalam identifikasi penghitungan rendemen protoplas hasil isolasi.

Protoplas yang terbentuk tampak utuh, tidak mengalami kerusakan dalam inkubasi selama 3 jam yang dikocok dalam pengocok berkecepatan 50 rpm pada kondisi gelap dengan zat osmotikum berupa mannitol 25 mM. Dengan demikian, waktu inkubasi isolasi protoplas kacang panjang asal mesofil daun selama 3 jam dapat dijadikan formula karena mampu memberikan protoplas yang baik. Mannitol 25 mM yang digunakan sebagai osmotikum atau sering disebut sebagai zat antipecah atau *anti blasting* mampu menjaga kestabilan tekanan antara sitoplasma dengan larutan enzim sehingga protoplas tidak pecah. Rendemen protoplas tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan konsentrasi enzim *Cellulase RS* 3,0% b/v sebesar 17,4 x 10<sup>5</sup> protoplas/g berat segar mesofil daun.

Perlakuan enzim *Cellulase RS* dapat mengisolasi protoplas dengan rendemen cukup tinggi. Hal ini membuktikan bahwa enzim *Cellulase RS* secara individual mampu mengisolasi protoplas kacang panjang asal mesofil. *Cellulase RS* termasuk salah satu jenis enzim yang berfungsi melarutkan dinding sel berupa selulosa. Pengocokan selama 3 jam pada kondisi gelap akan mempercepat proses isolasi protoplas tersebut sehingga dapat meningkatkan rendemen protoplas. Peningkatan densitas rendemen protoplas seiring dengan peningkatan konsentrasi enzim *Cellulase RS*. Hal ini dimungkinkan adanya proses pelarutan dinding sel selulosa dan derivat-derivatnya yang bergantung pada konsentrasi enzim *Cellulase RS* yang tepat dan optimum. Untuk melarutkan dinding sel yang tersusun dari selulosa digunakan enzim *Cellulase*. Konsentrasi enzim *Cellulase RS* yang optimum dapat mengisolasi protoplas dalam jumlah lebih banyak dengan kondisi protoplas yang baik (*intact*).

Konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* memberikan hasil yang berbeda. Rendemen protoplas tertinggi dicapai oleh perlakuan konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* 0,5% b/v, yaitu  $17,46 \times 10^5$  protoplas/g berat segar mesofil.

Enzim *Macerozyme R-10* adalah salah satu jenis enzim *Pectinase* yang berfungsi melarutkan dinding sel primitif yang tersusun atas zat *pectin*. Enzim *Macerozyme* digunakan untuk memisahkan atau maserasi jaringan tanaman sehingga sel-sel tersebut terlepas menjadi sel-sel tunggal dan akhirnya melarutkan dinding sel yang masih tersisa sehingga terbentuk protoplas yang transparan berbentuk bulat dan utuh. Pengaruh Perlakuan Interaksi antara Enzim *Cellulose RS* dengan *Macerozyme R-10* Rendemen protoplas kacang panjang hasil isolasi dari perlakuan interaksi antara enzim *Macerozyme R-10* dengan enzim *Cellulase RS* jauh lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan enzim tersebut secara individual. Penggabungan enzim *Macerozyme* dengan *Cellulase RS* memberikan protoplas yang lebih baik.

Tingginya rendemen protoplas kacang panjang yang terisolasi dari perlakuan interaksi kedua enzim tersebut, berarti antara enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* terdapat interaksi positif. Keadaan ini menyebabkan penggabungan kedua enzim tersebut akan terjadi saling tindak atau saling mempengaruhi untuk meningkatkan rendemen protoplas yang terisolasi dibandingkan dengan pengaruh kedua enzim



secara individual. Untuk proses isolasi protoplas akan lebih baik bila menggunakan kombinasi enzim *Cellulase* dengan *Pectinase* seperti *Macerozyme*. Kombinasi enzim ini akan meningkatkan densitas protoplas hasil isolasi. Protoplas hasil isolasi yang kondisinya baik (bulat, utuh, dan viabel) dalam jumlah cukup siap dikulturkan atau diperlakukan lebih lanjut dengan hasil yang lebih efektif dan efisien dengan potensi keberhasilan yang lebih tinggi.

#### **D. Perbaikan Sifat Genotipe Melalui Fusi Protoplas**

Salah satu tujuan fusi protoplast adalah untuk menghasilkan sifat-sifat unggul pada berbagai tanaman. Lada, nilam, dan terung merupakan jenis komoditas yang memiliki nilai ekonomi yang sangat tinggi. Berikut ini merupakan penjelasan perbaikan sifat genotif tanaman melalui fusi protoplas yang dikemukakan oleh Mariska dan Ali Husni (2006).

Aplikasi bioteknologi diharapkan dapat mengatasi berbagai kendala dalam berproduksi yang tidak dapat diatasi melalui cara konvensional. Peningkatan produktivitas, misalnya, dapat dicapai melalui peningkatan potensi genetik tanaman serta ketahanan terhadap hama, penyakit, dan cekaman lingkungan. Bioteknologi tanaman pada dasarnya dapat dilakukan melalui dua cara, yaitu kultur *in vitro* dan rekombinasi DNA. Perbaikan genetik tanaman melalui kultur *in vitro* dapat dilakukan melalui beberapa cara, antara lain peningkatan keragaman somaklonal, penyelamatan embrio, fertilisasi *in vitro*, kultur haploid, dan fusiprotoplas (hibridisasi somatik). Dalam hibridisasi seksual terdapat hambatan apabila kedua tetua yang disilangkan mempunyai hubungan kekerabatan yang jauh serta sitoplasma hanya berasal dari tetua betina.

Salah satu alternatif untuk mengatasi hambatan tersebut adalah melalui fusi protoplas yang dapat memindahkan gen yang belum teridentifikasi dan sifat yang diwariskan secara poligenik. Keragaman tanaman yang dihasilkan melalui fusi protoplas lebih tinggi dibandingkan melalui persilangan seksual karena: 1) terjadinya segregasi inti dan sitoplasma yang menghasilkan kombinasi unik antara informasi genetik pada inti dan sitoplasma, 2) instabilitas kombinasi inti sel yang menyebabkan

hilangnya beberapa informasi genetik, dan 3) variabilitas akibat subkultur relatif tinggi sehingga dapat membentuk keragaman somaklonal. Fusi protoplas dapat dilakukan secara simetris dan asimetris. Fusi simetris didapat dengan menggabungkan dua jenis genom sehingga diperoleh hasil yang bersifat antara (*intermediate*). Fusi asimetris didapat dengan cara genom inti salah satu tetua dihilangkan (melalui iradiasi) dan tetua yang lain dihilangkan sitoplasmanya dengan iodoasetomide. Hasil fusi asimetris umumnya disebut dengan nama cybrid.

Penelitian fusi protoplas telah menghasilkan hibrida-hibrida somatik yang mempunyai sifat-sifat seperti yang diharapkan, antara lain tahan terhadap hama dan penyakit, produktivitas tinggi, dan sifat-sifat kualitatif yang lebih baik, seperti kandungan minyak tinggi. Fusi simetris dapat menghasilkan keragaman genetik yang tinggi yang bermanfaat dalam program pemuliaan. Melalui beberapa kali silang balik (*back cross*) dilanjutkan dengan seleksi dapat dihasilkan kultivar baru. Tulisan ini menyajikan hasil-hasil penelitian fusi protoplas pada tanaman lada, nilam, dan terung. Indonesia merupakan pemasok lada terbesar kedua di dunia setelah India.

Salah satu masalah dalam pengembangan lada adalah serangan penyakit yang disebabkan oleh *Phytophthora capsici*, sementara varietas lada yang tahan penyakit tersebut belum ditemukan. Sifat ketahanan terhadap penyakit terdapat pada lada liar, seperti *Piper colibrinum*, *P. hirsutum*, *P. aurifolium*, dan *P. cubeba*. Pemindahan sifat ketahanan terhadap penyakit dari lada liar ke lada budi daya secara seksual sulit dilakukan. Untuk mengatasi masalah tersebut telah dilakukan fusi protoplas. Melalui fusi protoplas, sel hibrida dapat memanfaatkan gabungan sitoplasma dari kedua tetuanya. Di samping itu, sifat lainnya yang berasal dari sitoplasma tetua jantan ikut diperoleh. Langkah awal yang menentukan keberhasilan fusi protoplas adalah mendapatkan protoplas kedua tetua dengan densitas yang tinggi. Penghancuran dinding sel dengan menggunakan enzim selulase dikombinasikan dengan macerozim dapat menghasilkan protoplas dengan struktur yang sempurna dan densitas yang tinggi. Kombinasi selulase R-10 2% dan macerozim 0,50% dalam larutan CPW menghasilkan protoplas yang paling banyak, baik untuk lada liar maupun lada budi daya. Untuk fusi digunakan PEG 6000 konsentrasi 30% selama 25 menit. Protoplas

yang telah mengalami fusi ditunjukkan dengan volume protoplas yang makin besar. Keberhasilan protoplas yang mengalami fusi masih rendah, yaitu 20%.

Setelah fusi, sel hibrida dikulturkan pada beberapa formulasi media. Koloni mikrokalus dapat diperoleh dengan menambahkan sukrosa 3% pada media  $\frac{1}{2}$  LV + ABA 0,01 mg/l + casein hidrolisat 50 mg/l + BA (4,50 mg/l). Koloni sel tidak terbentuk pada media dengan sukrosa 2%. Untuk mendorong pertumbuhan mikrokalus dan regenerasinya maka mikrokalus disubkultur pada media baru. Pada media baru tersebut, mikrokalus berhasil tumbuh dan berwarna hijau. Perubahan warna dari putih menjadi hijau menandakan klorofil mulai terbentuk yang dibutuhkan untuk regenerasi koloni mikrokalus. Untuk lebih memacu pertumbuhan, di atas media padat dapat diberi selapis tipis media cair MS + 2,4 D 2 mg/l + thidiazuron 0,10 mg/l. Setelah pemberian media tersebut, koloni baru mulai terbentuk dan kalus tumbuh dengan cepat yang ditandai dengan penambahan ukuran koloni.

Nilam (*Pogostemon cablin*) merupakan tanaman penghasil minyak atsiri yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Indonesia merupakan pemasok minyak nilam terbesar di pasaran dunia. Tanaman nilam yang dibudidayakan di Indonesia tidak berbunga sehingga sulit mendapatkan genotipe baru melalui persilangan seksual. Selain itu, pengembangan nilam menghadapi masalah serangan nematoda *Pratylenchus brachyurus*. Sifat ketahanan terhadap nematoda tersebut terdapat pada nilam Jawa (Girilaya) yang produksi minyaknya rendah. Untuk memindahkan sifat ketahanan tersebut maka dilakukan fusi protoplas antara nilam Jawa dan nilam Aceh (budi daya) yang kadar minyaknya tinggi.

Isolasi protoplas menggunakan kombinasi pektinase 0,50% dengan selulase 0,50% dan 1% selama 16 jam. Penggunaan selulosa 0,50% dan kombinasi macerozim 0,50% menghasilkan protoplas dengan densitas yang tinggi. Peningkatan konsentrasi selulosa umumnya menurunkan densitas protoplas. Densitas protoplas paling tinggi terdapat pada nilam Girilaya dengan selulosa 2%.

Fusi protoplas antara dua tetua nilam dengan menggunakan PEG 6000 dengan konsentrasi 30% memberikan persentase keberhasilan 5,60% per bidang pandang untuk fusi biner dan 10% untuk multifusi. Untuk PEG 50%, keberhasilan pada fusi

biner lebih tinggi yaitu 16,70% dan untuk multifusi 17,60%. Protoplas hasil fusi kemudian dicuci 2–3 kali dan dikulturkan dalam media KM8P dan VKM yang diberi 2,4 D 0,30 mg/l + NAA 1 mg/l. Dari fusi protoplas tersebut diperoleh 30 genotipe baru. Setiap genotipe selanjutnya dianalisis kandungan lignin total dan fenol pada akar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman yang tahan nematoda mempunyai kandungan fenol dan lignin yang lebih tinggi daripada tanaman yang rentan. Pada tanaman pisang senyawa fenol dan lignin memiliki hubungan yang sangat erat dengan ketahanan terhadap nematoda *R. similis*. Untuk itu, nomor-nomor baru hasil fusi perlu dilakukan analisis kandungan fenol dan lignin serta dibandingkan dengan nilam Jawa yang tahan dan nilam Aceh yang rentan. Kandungan fenol yang tinggi diperoleh dari nomor 9 II 34–0,10 sebesar 97,40 ppm, lebih besar dari tetuanya nilam Jawa. Untuk lignin, terdapat 10 nomor hasil fusi dengan kandungan lignin hampir sama dengan nilam Jawa.

Di samping kandungan fenol dan lignin yang beragam, tanaman hasil fusi juga memperlihatkan keragaman fenotipik juga mempunyai ukuran daun lebih besar dan jumlah daun lebih banyak dibandingkan kedua tetuanya. Hasil tersebut menunjukkan bahwa fusi protoplas dapat digunakan untuk meningkatkan keragaman genetik pada tanaman nilam. Berdasarkan keragaman yang ditimbulkan tersebut kemudian dilakukan uji ketahanan terhadap nematoda.

Terung (*Solanum melongena* L.) merupakan salah satu jenis sayuran penting di daerah tropis dan subtropis. Salah satu kendala dalam pengembangan terung adalah serangan penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum*, jamur *Fusarium oxysporum* dan *F. melongena*, serta nematoda *Meloidogyne* sp. Serangan penyakit layu bakteri di Jawa, Sumatera, Bali, Lombok, dan Sulawesi menyebabkan kehilangan hasil 15–95%. Sumber ketahanan terhadap penyakit layu pada terung terdapat pada kerabat liarnya, seperti *Solanum sanitwongsai*, *S. torvum* (takokak), *S. sysimbrifolium*, dan *S. aethiopicum*.

Persilangan seksual antara terung budi daya dan kerabat liarnya sering mengalami kegagalan karena adanya ketidaksesuaian (*incompatibility*) atau F1 yang dihasilkan sering steril. Untuk mengatasi masalah tersebut dapat digunakan fusi

protoplas antara *S. melongena* dan *S. torvum* atau *S. aethiopicum* dilanjutkan dengan kultur anther dan hibridisasi silang balik. Protoplas diisolasi dari daun secara *in vitro* dengan menggunakan enzim selulase dan pektinase.

Jumlah protoplas paling banyak dihasilkan oleh kultivar Kopek ( $14,27 \times 10^5$  protoplas/g daun), diikuti oleh kultivar Dourga ( $14,07 \times 10^5$ ) dan Medan ( $12,91 \times 10^5$ ). Jumlah protoplas yang dihasilkan kultivar Kopek dan Dourga tidak terlalu berbeda, sedangkan rata-rata jumlah protoplas kultivar Medan lebih sedikit dibanding kultivar Kopek dan Dourga. Protoplas hanya dapat membentuk dinding sel pada media yang diinkubasi dalam keadaan tanpa cahaya, baik pada media KM8P maupun VKM dengan penambahan 2,4 D 0,20 mg/l + zeatin 0,50 mg/l + NAA 1 mg/l. Kultur protoplas yang disimpan dengan pemberian cahaya 1.000 lux selama 12 jam/hari tidak dapat membentuk dinding sel.

Perkembangan protoplas semua kultivar pada media dasar KM8P lebih baik dibanding pada media VKM. Persentase protoplas yang dapat membentuk dinding sel dan melakukan pembelahan tertinggi terdapat pada kultivar Kopek, diikuti oleh kultivar Medan dan Dourga. Fusi protoplas dilakukan dengan menggunakan PEG 6000 konsentrasi 30% selama 20 menit untuk mendorong pertumbuhan dan perkembangan protoplas membentuk koloni sel. Media KM8P + 2,4 D 0,20 mg/l + zeatin 0,50 mg/l + NAA 1 mg/l memberikan hasil terbaik.

Tabel 3. Densitas protoplast pada nilam dengan pemberian konsentrasi enzim pektinase 0,50% dengan berbagai selulosa.

Jenis Nilam	Densitas Protoplast		
	Sellulase 0,50%	Sellulase 1%	Sellulase 2%
Girilaya	$3 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	$2,10 \times 10^6$
TT 75	$4,40 \times 10^6$	$1,90 \times 10^6$	$1,40 \times 10^6$

Tabel 4. Rata-rata jumlah protoplast terung dari setiap gram daun setelah inkubasi 16 jam dalam larutan selulase 0,50% macerozim 0,5%.

Kultivar	Densitas protoplast ( $10^5$ )
Kopek	$14,27 \pm 6,34$
Medan	$12,91 \pm 2,04$
Dourga	$14,07 \pm 3,89$

Setelah terbentuk koloni sel, penambahan 2,4 D 0,10 mg/l + BAP 2 mg/l pada media pengenceran dapat meningkatkan kemampuan protoplas membentuk kalus. Regenerasi kalus membentuk tunas adventif dapat terjadi pada media MS + vitamin Morel Vettmore + IAA 0,10 mg/l + zeatin 2 mg/l. Hibrida somatik yang terbentuk kemudian dikarakterisasi ketahanannya terhadap penyakit. Karakterisasi ketahanan hibrida somatik terhadap penyakit layu bakteri dilakukan di Kebun Percobaan Pacet (1.000 m dpl) dan Kebun Percobaan Cibadak (1.200 m dpl). Tanaman umur 1 bulan sejak aklimatisasi diinokulasi dengan cara disiram suspensi bakteri *R. solanacearum* T926 di sekitar akar tanaman yang telah dilukai. Selanjutnya tanaman diinkubasi selama 2 hari lalu dipindahkan ke lapangan. Tanaman yang bertahan di lapangan dikarakterisasi pertumbuhan dan produksinya. Karakterisasi genetis dan molekuler meliputi jumlah kromosom, markah spesifik spesies dan isoenzim. Hasil uji ketahanan menunjukkan bahwa hibrida somatik tahan terhadap infeksi *R. solanacearum*, bahkan beberapa di antaranya lebih tahan dari kerabat liarnya (Tabel 4). Hal ini terjadi karena hibrida somatik umumnya lebih vigor daripada terung maupun kerabat liarnya, namun potensi hasilnya lebih rendah dari terung. Ukuran dan bentuk buah hibrida berada antara terung budi daya dan kerabat liarnya serta rasanya pahit. Hibrida hasil fusi antara terung dan takokak tidak menghasilkan buah karena bunga selalu gugur sebelum mekar. Hal ini diduga karena adanya ketidaksesuaian sehingga fusi asimetris dirintis untuk diterapkan.

Produksi galur dihaploid dari hasil fusi protoplas antara *S. melongena* dan *S. aethiopicum* yang tahan terhadap *R. solanacearum* dan *F. oxysporum* f.sp *melongen*is dilakukan oleh ISO dan Universitas Paris. Teknik ini sedang dikembangkan oleh

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BBBiogen).

### **LATIHAN SOAL**

Kedelai merupakan salah satu bahan pokok utama di Indonesia. Kedelai merupakan bahan utama untuk pembuatan berbagai kebutuhan seperti tempe, tahu, kecap, dan susu. Hingga saat ini sebagian besar kedelai diimport dari negara lain. Saat ini sebagian besar lahan pertanian di Indonesia digunakan untuk budidaya kelapa sawit. Lahan di bawah naungan sawit sebenarnya bisa dimanfaatkan sebagai lahan untuk budidaya tanaman kedelai. Budidaya kedelai di bawah naungan sawit memiliki keuntungan bagi sawit karena akar kedelai bersimbiosis dengan bakteri pengikat nitrogen sehingga dapat menyuburkan tanah. Sebagian besar kultivar kedelai merupakan kultivar yang membutuhkan cahaya penuh. Untuk mendapatkan kultivar kedelai yang tahan naungan dapat dilakukan dengan fusi protoplas. Seandainya kamu mau melakukan penelitian untuk mendapatkan kedelai seperti yang dimaksud diatas. Buatlah rencana penelitian tersebut melalui fusi protoplast. Rencana penelitian meliputi:

1. Pemilihan sumber tanaman induk
2. Jenis enzim yang digunakan
3. Jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan
4. Jenis media yang digunakan
5. Metode fusi yang digunakan

## **BAB VIII**

### **PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER TUMBUHAN MELALUI KULTUR *IN VITRO***

#### **Capaian Pembelajaran:**

3. Mahasiswa dapat menjelaskan proses produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan.
4. Mahasiswa dapat menjelaskan keuntungan produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan.

#### **A. Pendahuluan**

Metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan telah lama manusia digunakan sebagai sebagai obat, pewarna, insektisida. Salah satu fungsi metabolit sekunder yang menonjol bagi manusia adalah pemanfaatan sebagai obat. Badan kesehatan dunia memperkirakan sekitar 60-80% penduduk dunia masih mengantungkan kesehatannya yang berasal dari tumbuhan dan 25% obat modern yang beredar diekstraksi langsung dari tumbuhan.

Berbagai tumbuhan yang digunakan sebagai obat adalah pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack), pegagan (*Centella asiatica* L.Urban), kumis kucing (*Otrhosiphon stamineus* Benth), kunyit (*Curcuma domestica* Val.) dan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat sejalan dengan perkembangan peradapan manusia. Pada awalnya manusia menggunakan tumbuhan dalam bentuk utuh (segar, simplisia) hingga senyawa yang telah dimurnikan.

Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat berhubungan dengan kandungan metabolit sekunder yang dimiliki tumbuhan. Metabolit sekunder adalah produk yang dihasilkan dari proses metabolisme sekunder. Tumbuhan menghasilkan 200.000 lebih metabolit sekunder. Beberapa metabolit sekunder yang digunakan sebagai obat antara lain kodein, ephederin, ajmalisin, morfin, ppaperin, kuinin, reserpin, galantamin, scopolamine, berberine, kaffein, kapsiin, Kolkhisin, yombin, pilocarpin,



glikosida jantung. Hingga saat ini berbagai senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan memiliki struktur yang sangat kompleks dan tidak bisa dibuat senyawa sintetisnya.

Tumbuhan menghasilkan berbagai jenis metabolit sekunder, namun kadarnya sangat rendah dan pembentukannya sering berhubungan dengan tahap perkembangan tumbuhan. Metabolit sekunder tumbuhan dapat diperoleh dengan mengekstrak tumbuhan utuh. Ekstraksi metabolit sekunder dari tumbuhan utuh, sering menghadapi kendala disebabkan keterbatasan jumlah pasokan serta besarnya biaya yang dibutuhkan untuk purifikasi.

Kultur *in vitro* merupakan alternatif yang dianggap efisien untuk memproduksi metabolit sekunder. Keuntungan-keuntungan tersebut, antara lain (a) dengan teknologi kultur jaringan dapat dibentuk senyawa bioaktif dalam kondisi terkontrol dan waktu yang relatif lebih singkat (b) kultur bebas dari kontaminasi mikroba (c) setiap sel dapat dihasilkan untuk memperbanyak senyawa metabolit sekunder tertentu (4) pertumbuhan sel terawasi dan proses metabolismenya dapat diatur secara rasional) kultur jaringan tidak bergantung kepada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim, dan musim.

Kebutuhan senyawa obat semakin tinggi sementara lahan dan plasma nutfah semakin menyusut, oleh karena itu diperlukan alternatif pemecahan. Teknik kultur jaringan tumbuhan dapat digunakan untuk mengatasi masalah tersebut. Melalui teknik ini, metabolit sekunder yang dihasilkan dalam jaringan tanaman utuh dapat dihasilkan juga dalam sel-sel yang dipelihara pada medium buatan secara aseptik.

Problem utama dalam produksi metabolit sekunder melalui teknik *in vitro*, konsentrasi produk yang menjadi target masih kecil. Salah satu teknik yang digunakan untuk meningkatkan produk metabolit sekunder pada kultur *in vitro* adalah dengan pemberian prekursor (Pandiangan 2010). Prekursor adalah senyawa yang berada pada posisi awal atau ditengah-tengah jalur biosintesis produk sekunder sehingga dapat mempengaruhi produk akhir.

## **B. Metabolit Sekunder Tumbuhan**

Metabolit yang dimiliki tumbuhan dibedakan menjadi metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer adalah produk yang dihasilkan dari proses metabolisme primer seperti karbohidrat, protein, lemak dan asam nukleat. Metabolit sekunder merupakan hasil dari proses metabolisme sekunder. Metabolit sekunder pada tumbuhan kadarnya relatif sedikit dibandingkan dengan metabolit primer namun jenisnya sangat banyak. Fiehn menyatakan bahwa tumbuhan menghasilkan 200.000 lebih metabolit sekunder.

Pada tumbuhan senyawa metabolit sekunder berfungsi sebagai fitohormon, pigmen fotosintesis, pigmen aksesoris, alelopati, adaptasi, penarik polinator, serta pertahanan dari herbivore, mikroorganisme dan juga untuk pertumbuhan dan perkembangan. Metabolit sekunder yang dimiliki tumbuhan digunakan manusia sebagai pewarna, kosmetik, insektisida, penyedap rasa dan juga sebagai obat.

Salah satu pengelompokan metabolit sekunder tumbuhan dikelompokkan yang banyak digunakan adalah berdasarkan struktur kimia dan aktivitas fisiologi. Berdasarkan struktur kimia metabolit sekunder dikelompokkan menjadi (1) senyawa fenol yang di dalamnya termasuk fenilpropaniol dan flavonoid; (2) senyawa yang mengandung nitrogen yang di dalamnya termasuk alkaloid; (3) terpen dan terpenoid. Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat mengelompokkan tumbuhan metabolit sekunder berdasarkan aktivitas fisiologi dan efek terapeutik.

Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan bervariasi dalam jenis dan kuantitasnya. Jenis metabolit sekunder yang dihasilkan sering berasosiasi dengan tingkat pertumbuhan. Sebagai contoh anthosianin dihasilkan saat fase pembungaan, dan klorofil dihasilkan pada daun. Jenis metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan juga bervariasi antara satu organ dengan organ tumbuhan lainnya. *Catharanthus roseus* L.(G.) Don mengakumulasi ajmalisin pada organ akar sedangkan katharantin dan vinblastin ditemukan dibagian daun, triterpenoid (asiatikosida, madekasid, asam asiatik) ditemukan pada bagian daun *C. asiatica*.

Perbedaan kandungan metabolit sekunder yang dimiliki tumbuhan sangat dipengaruhi oleh lingkungan dan genetik. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *C. asiatica* memiliki variasi kandungan metabolit sekunder. Perbedaan keragaman

sifat morfologi seperti warna, ukuran, bentuk stolon dan daun mempengaruhi kandungan asiatikosida. Kandungan triterpenoid yang tinggi dapat diperoleh pada *C.asiatica* yang mendapat cahaya penuh.

Produksi alkaloid dari berbagai kultur sel dan kultur organ dari spesies *Cinchona* secara jelas menunjukkan bahwa diferensiasi paralel dengan produksi alkaloid. Pembentukan metabolit sekunder akan lebih banyak pada saat kalus berdiferensiasi menjadi tunas maupun akar. Keberhasilan pembentukan metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* sangat tergantung pada faktor-faktor yang mempengaruhi pembentukan metabolit tersebut pada tanaman utuh.

Kultur *in vitro* merupakan teknik penanaman sel, jaringan, dan organ yang telah dipisahkan dari lingkungan alamnya dan ditumbuhkan pada medium buatan yang sesuai dalam kondisi steril. Kultur *in vitro* meliputi kultur kalus, suspensi sel, agregat sel, kultur akar, meristem, akar adventif dan kultur organ. Salah satu tujuan dilakukan kultur *in vitro* adalah produksi metabolit sekunder terutama senyawa yang berkhasiat obat.

Kultur *in vitro* mulai diperkenalkan pada akhir tahun 1960 sebagai alat untuk mempelajari produksi metabolit sekunder tumbuhan. Pemanfaatan kultur *in vitro* didasarkan oleh teori totipotensi sel yang menyatakan bahwa setiap sel membawa informasi genetik yang sama dengan genetik induknya. Hal ini berimplikasi bahwa tumbuhan yang dikultur secara *in vitro* akan menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan tumbuhan induknya.

Penerapan kultur *in vitro* untuk menghasilkan metabolit sekunder mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan penggunaan konvensional. Keuntungan-keuntungan tersebut, antara lain (a) dengan teknologi kultur jaringan dapat dibentuk senyawa bioaktif dalam kondisi terkontrol dan waktu yang relatif lebih singkat (b) kultur bebas dari kontaminasi mikroba (c) setiap sel dapat dihasilkan untuk memperbanyak senyawa metabolit sekunder tertentu (4) pertumbuhan sel terawasi dan proses metabolisme dapat diatur secara rasional) kultur jaringan tidak bergantung kepada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim, dan musim.

Berbagai penelitian telah menggunakan kultur *in vitro* untuk menghasilkan metabolit sekunder baik berskala kecil maupun besar. Usaha untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder melalui pembentukan pada berbagai tumbuhan telah banyak dilakukan, antara lain senyawa glukotropaeolin dari *Tropaeolum majus*, senyawa solasodine dari *Solanum aviculare* Forst dan *Solanum nigrum* L., senyawa ajmalisin dan katarantin dari *C. roseus*.

Keberhasilan kultur *in vitro* untuk menghasilkan metabolit sekunder dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain, jenis media dan zat pengatur tumbuh. Medium yang umum digunakan pada penelitian kultur *in vitro* adalah medium MS dan B5. Medium MS digunakan secara luas untuk tujuan mikropropagasi baik morfogenesis langsung, maupun morfogenesis tidak langsung, dan produksi metabolit sekunder. Pemilihan medium yang digunakan dalam kultur *in vitro* yang tepat dapat menentukan keberhasilan pertumbuhan dan perkembangan suatu kultur. Pada *C. roseus* kultur yang dipelihara pada medium B5 menghasilkan ajmalisin yang lebih tinggi dibandingkan dengan medium MS.

Pertumbuhan dan perkembangan kultur juga dipengaruhi oleh penambahan zat pengatur tumbuh. Auksin dan sitokinin merupakan dua macam zat pengatur tumbuh yang digunakan secara luas untuk kultur. Pada kultur kalus *O. Aristatus* pada penambahan 2,4-D (2,4-diclorofenoksi acetat acid) mengakibatkan kalus meremah dengan kandungan sinestesin yang rendah sedangkan pada penambahan 2,4-D dan BAP (*benzyl amino purine*) secara bersamaan akan membentuk kalus relatif lebih kompak dengan kandungan sinestesin yang lebih tinggi. Struktur kalus *C. roseus* berhubungan dengan kemampuannya mensintesis indol alkaloid. Kalus kompak *C. roseus* menghasilkan indole alkaloid lebih tinggi sebesar 1,9 - 2,4 kali dibandingkan dengan kalus meremah. Pada kultur kalus *C. roseus* yang dipelihara pada medium Zenk akan membentuk kalus kompak, berwarna coklat dengan kandungan ajmalisin yang tinggi.

Pemanfaatan kultur *in vitro* untuk memproduksi metabolit sekunder telah berkembang dengan pesat, namun demikian kultur invitro memiliki beberapa kelemahan diantaranya kandungan metabolit sekunder yang diinginkan rendah. Untuk

memproduksi metabolit sekkunder melalui teknik invitro diperlukan langkah-langkah sebagai berikut: (1) pemilihan tanaman yang memilki produksi metabolit sekunder yang tinggi; (2) pembuatan kultur in vitro dari sel tanaman terpilih; (3) pengembangan medium pertumbuhan optimum; (4) pengembangan metode untuk menginduksi pembentukan metabolit yang diinginkan dan (5) pengembangan medium produksi yang optimum.

Pola pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder dikelompokkan menjadi ;(1) pembentukan metabolit sekunder terjadi pada akhir fase lag, misalnya produksi antrakuinon pada kultur suspensi sel *Morinda*; (2) pembentukan metabolit sekunder terjadi pada fase akselerasi, misalnya produksi asam sinamat pada kultur *Daucus*; (3) pembentukan metabolit sekunder sejalan dengan pertumbuhan sel, misalnya produksi nikotin pada kultur suspensi sel *Nicotiana tabacum*; (4) produksi metabolit sekunder pada fase stasioner misalnya produksi sikonin pada kultur sel *Lithospermum erythorhizon*.

### C. Prekursor

Produksi metabolit sekunder dapat digunakan dengan menggunakan kultur kalus, kultur suspensi sel, kultur agregat maupun kultur organ. Hingga saat ini salah satu kendala yang dihadapi untuk memproduksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* kadar yang dihasilkan masih rendah. Beberapa penelitian juga memperlihatkan kultur *in vitro* kehilangan kemampuannya untuk menghasilkan metabolit yang diinginkan setelah mengalami beberapa kali pemindahan media. Kultur *in vitro* aktivitas biosintesis metabolit sekunder bervariasi berhubungan dengan pertumbuhan sel.

Berbagai metode telah diterapkan untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada kultur in vitro diantaranya melalui elisitasi dan penambahan prekursor. Elisitasi adalah penambahan elisitor kedalam kultur *in vitro*. Konsep elisitasi berkembang dari adanya fenomena alam bahwa infeksi patogen pada tumbuhan akan menginduksi pembentukan metabolit sekunder karena danya cekaman. Penambahan elisitor pada mediu tumbuh kultur *in vitro* tumbuhan ternyata cukup efektif untuk

meningkatkan kandungan metabolit sekunder, namun elisitasi tersebut mengakibatkan penurunan pertumbuhan dan mengakibatkan kematian sel.

Kandungan metabolit sekunder melalui teknik *in vitro* dapat ditingkatkan dengan cara optimasi media baik internal maupun eksternal, dengan menggunakan prekursor. Keberhasilan penambahan prekursor terhadap media kultur ditentukan pengetahuan jalur metabolisme senyawa metabolit yang diinginkan.

Reaksi kimia yang terjadi pada yang metabolisme sekunder ditentukan oleh ketersediaan prekursor. Enzim-enzim yang terlibat dalam proses metabolisme sekunder menjadi tidak maksimum aktivitasnya dikarenakan konsentrasi prekursor sangat sedikit. Prekursor adalah senyawa yang berada pada posisi awal atau ditengah-tengah jalur biosintesis produk sekunder sehingga dapat mempengaruhi produk akhir.

Penelitian penggunaan prekursor untuk meningkatkan metabolit sekunder mulai berkembang pada tahun 1970-an. Berbagai jenis prekursor yang digunakan triptopan dan triptamin, asam amino, metionin, triftofan, triptopan, tryptamin, loganin dan secologanin. Penambahan berbagi prekursor ke dalam kultur media terbukti mampu meingkatkan kandungan metabolit sekunder.

Jenis prekursor yang digunakan akan mempengaruhi kadar metabolit sekunder. Metabolisme sekunder dalam tanaman juga sangat dipengaruhi oleh perubahan ekspresi dari gen-gen pengatur. Akumulasi terpenoid indol alkaloid (TIA) pada kultur sel *C. roseus* lebih tinggi pada saat pemberian loganin dibandingkan dengan sekologanin, sedangkan pemberian triftamin dan triptofan tidak mempengaruhi kandungan TIA.

Penambahan prekursor pada kultur *in vitro* akan menginduksi enzim-enzim yang terlibat dalam proses metabolisme sekunder. Sebagai contoh peningkatan kandungan TIA pada kultur suspensi sel *C. roseus* berhubungan dengan peningkatan kadar enzim triptofan dekarboksilase. Distribusi dari transkripsi mRNA, enzim dan prekursor biosintesis merupakan komponen yang sangat penting dalam regulasi proses metabolit sekunder tumbuhan. Penambahan prekursor pada media kultur meskipun dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder, tapi dapat pula mengakibatkan

pertumbuhan selnya rendah. Penambahan asam amino pada kultur suspensi sel *C. asiatica* akan meningkatkan kandungan asitikosida.

#### **D. Elisitasi**

Tulisan ini disarikan dari Silalahi (2010). Teknik yang telah banyak diteliti untuk meningkatkan senyawa kandungan metabolit sekunder diantaranya melalui amobilisasi, modifikasi media, dan juga elisitasi. Elisitasi adalah suatu metode untuk meningkatkan fitoaleksin dan metabolit sekunder lainnya dengan menambahkan berbagai elisitor, baik berupa faktor biotik maupun abiotik.

Pada tanaman *C. roseus* elisitasi dengan menggunakan jamur *Pythium aphanidermatum* sudah banyak diteliti dan terbukti mampu meningkatkan kandungan ajmalisin. Elisitasi menggunakan homogenate jamur *P. aphanidermatum* ternyata dapat meningkatkan kandungan ajmalisin sebesar 66,4% pada kultur kalus *C. roseus*, sedangkan pada kultur kalus berakar meningkatkan kandungan ajmalisin sebesar 148,9% pada konsentrasi elisitor 1mg BK/mL.

Penggunaan jamur *P. aphanidermatum* sering mengalami hambatan karena jamur tersebut pathogen yang berbahaya bagi kesehatan manusia, sehingga perlu dicari alternatif lain. Penggunaan ragi sebagai bahan elisitor mempunyai beberapa kelebihan diantaranya, mudah diperoleh dan tidak pathogen pada manusia, siklus hidupnya pendek dan mudah ditemukan. Glukan dari ekstrak ragi efektif menginduksi sintesis phaseolin pada kultur sel *Glicine max*. Produksi barberin pada kultur sel *Thalictrum rugosum* dapat meningkat 4 kali lipat, dan alkaloid pada kultur *Eschscholzia californica* meningkat 30 kali lipat setelah dielisitasi dengan ekstrak ragi.

Pemberian elisitor serbuk *S. cerevisiae* mempengaruhi kandungan ajmalisin pada kultur kalus *C. roseus*. Kandungan ajmalisin tertinggi diperoleh dengan pemberian elisitor pada konsentrasi 0,5% (g/v) dengan waktu pemanenan 36 jam yaitu sebesar  $303,475 \pm 5,602 \mu\text{g/g BK}$  (tabel 1). Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa pemberian elisitor pada konsentrasi tertentu dapat meningkatkan kandungan ajmalisin tetapi pada konsentrasi lain tidak. Hal ini berarti bahwa kandungan

ajmalisin sangat dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor. Selain ditentukan oleh konsentrasi elisitor kandungan ajmalisin juga ditentukan oleh waktu pemanenan. Kandungan ajmalisin cenderung meningkat hingga waktu pemanenan 36 jam, tetapi pada waktu pemanenan yang lebih lama (72) jam kandungan ajmalisin mengalami penurunan kembali.

Elisitasi serbuk *S. cerevisiae* mengakibatkan pencoklatan dan penurunan berat kering kultur kalus *C. roseus*. Pencoklatan dan penurunan berat kering disebabkan adanya peningkatan senyawa fenolik dan metabolit sekunder lain, yang mengakibatkan penghambatan pertumbuhan. Senyawa fenolik yang dihasilkan oleh kultur *C. roseus* adalah asam 2,3 dihidroksibenzoat. Penurunan berat kering disebabkan adanya penghambatan aktivitas enzim IPP (isopentenildipospat) isomerase. Penghambatan aktivitas enzim IPP isomerase mengakibatkan penghambatan akumulasi senyawa squalen, yang merupakan prekursor untuk biosintesis triterpen dan fitosterol. Senyawa-senyawa tersebut dibutuhkan untuk multiplikasi (perbanyak) sel.

Konsentrasi elisitor dan waktu pemanenan mempengaruhi peningkatan kandungan ajmalisin pada kultur kalus *C. roseus*. Konsentrasi elisitor 0,5% g/v meningkatkan kandungan ajmalisin lebih tinggi dibandingkan dengan 1,0; 2,5% g/v. Hal tersebut diduga bahwa sel mempunyai jumlah reseptor untuk *S. cerevisiae* yang terbatas pada sel. Konsentrasi ajmalisin dapat tinggi jika konsentrasi elisitor tidak terlalu tinggi dan akan menurun pada saat konsentrasi elisitor tinggi. Konsentrasi elisitor yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan nekrosis yang kemungkinan mengakibatkan kerusakan atau kematian sel-sel.

Peningkatan kandungan ajmalisin pada kalus yang dielisitasi diduga karena elisitor yang diberikan menginduksi aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam sintesis ajmalisin. Endress (1994) menyatakan bahwa pada kultur sel *C. roseus* yang dielisitasi dengan *Pythium aphanidermatum* terjadi peningkatan transkripsi mRNA untuk sintesis SS (striktosidin sintase) dan TDC (triptofan dekarboksilase). Enzim tersebut merupakan enzim kunci dalam biosintesis ajmalisin.



Kandungan ajmalisin tertinggi diperoleh pada waktu pemanenan 36 jam, tetapi pada waktu pemanenan 72 jam kandungan ajmalisin mengalami penurunan kembali. Hal tersebut diduga diakibatkan penurunan aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesis ajmalisin, baik pada kultur secara keseluruhan maupun aktivitas enzim “post binding”. Aktivitas enzim PAL (fenilalanin ammonia liase) pada kultur suspensi sel *Hordeum vulgare* mencapai maksimum setelah 4 jam pemberian elisitor ekstrak ragi, dan aktivitas enzim PAL menurun kembali 24 jam setelah pemberian elisitor.

#### E. Peningkatan Produktivitas Metabolit Sekunder Melalui Kultur Sel.

Dalam tanaman, banyak metabolit sekunder yang dihasilkan oleh sel atau jaringan yang berbeda. Produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan telah dilakukan pada berbagai tanaman (Tabel 1.).

Tabel 1. Produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan

Nama Metabolit Sekunder	Nama tumbuhan penghasil
Vasine	<i>Adhatoda vasica</i>
Artemisinin	<i>Artemisia annua</i>
Azadirachtin	<i>Azadirachta indica</i>
Cathin	<i>Brucea javanica</i>
Capsiacin	<i>Capsicum annum</i>
Sennosides	<i>Cassia senna</i>
Ajmalicine, Secologanin, Indole alkaloids,	<i>Catharanthus roseus</i>
Vincristine	
Stilbenes	<i>Cayratia trifoliata</i>
Berberin	<i>Coscinium fenestratum</i>
Sterols	<i>Hyssopus officinalis</i>
Shikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>

Ginseng saponin	<i>Panax notoginseng</i>
Podophyllotoxin	<i>Podophyllum hexandrum</i>
Taxane Paclitaxel	<i>Taxus chinensis</i>

---

Peningkatan produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan dalam dilakukan melalui beberapa metode diantaranya:

- ✓ Seleksi tanaman induk (galur sel cell lini)  
Heterogenitas didalam tanaman dapat diseleksi melalui cellline bagi tumbuhan yang menghasilkan metabolit sekunder yang tinggi.
- ✓ Manipulasi medium.  
Kandungan dari medium seperti jenis nutrien, zat pengatur tumbuh yang digunakan, temperatur, cahaya mempegaruhi produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan. Sebagai contoh peningkatan konsentrasi sukrosa dari 3% menjadi 5% meningkatkan produksi asam rosamarinic hingga 5 kali. Pada kasus lain sikonon akan meningkat pada saat diberikan IAA, namun menurun ketika diberi zat pengatur tumbuh NAA dan 2,4-D.
- ✓ Pemberian elisitor  
Produksi dan akumulasi metabolit sekunder dapat diinduksi dengan pemberian elisitor. Elisitor dapat dihasilkan dari dinding sel tumbuhan dari derivat polisakarida seperti pektin, asam pektat, dan sellulosa. Akumulasi metabolit sekunder juga dapat ditingkatkan melalui stress yang disebabkan agent seperti UV, temperatur rendah atau tinggi, antibiotik, logam berat, kadar garam yang tinggi atau yang disebut dengan elisitor abiotik.
- ✓ Immobilisation  
Immobilisasi dilakukan dengan penangkapan (encapsulated) kultur sel dengan gel agarosa dan Calcium alginate atau penangkapan (entrapped) membran sel pada kutur jaringan.

## LATIHAN SOAL

1. Produksi metabolit sekunder dapat dilakukan dengan berbagai cara diantaranya dengan menggunakan elisitasi. Elisitasi merupakan penembahan elisitor ke dalam medium kultur jaringan dapat berupa elisitor biotik maupun elisitor abiotik. Hingga saat ini penelitian elisitasi sudah banyak dilakukan di Indonesia khususnya pada tanaman *Catharantus roseus* dengan menggunakan ekstrak dari berbagai mikroorganisme patogen maupun non patogen. Jelaskan bagaimana cara kerja elisitor sehingga dapat meningkatkan produksi ajmalisin pada kultur kalus maupun kultur sel *Catharantus roseus*!
2. Berbagai cara untuk meningkatkan metaboit sekunder seperti teknik immobilisasi, elisitasi dan modifikasi media. Jelaskan kelebihan dan kekurangan dari masing-masing teknik tersebut!

## **BAB IX**

### **BIOTEKNOLOGI SEL HEWAN**

#### **Capaian Pembelajaran:**

1. Mahasiswa dapat menjelaskan proses kultur jaringan hewan
2. Mahasiswa dapat menjelaskan aplikasi kultur jaringan hewan pada manusia

#### **A. Pendahuluan**

Pada mulanya (sekitar tahun 1910), kultur jaringan/sel hewan (*animal tissue/cell culture*) merupakan metode untuk mempelajari tingkah laku atau sifat-sifat sel hewan dalam keadaan fisiologis maupun dalam kondisi artifisial karena suatu perlakuan (*treatment*). Pada awalnya yang digunakan untuk kultur adalah jaringan sehingga kultur jaringan menjadi istilah yang digunakan.

Kultur jaringan (*tissue culture*) dalam arti luas menyangkut pengertian umum yang meliputi: kultur organ (*organ culture*), kultur jaringan (*explant culture*), dan kultur sel (*cell culture*). Kultur organ adalah kultur dari organ utuh atau sebagian organ yang secara histologis seperti halnya *in vivo*. Kultur jaringan dan/atau kultur sel merupakan kultur dispersi sel (sel yang telah dipisahkan) yang berasal atau yang didapat dari jaringan orisinal setelah terlebih dahulu mengalami pemisahan (*disagregasi*) secara mekanis, atau kimiawi (enzimatis).

Saat ini penggunaan teknik kultur sel sudah demikian luasnya dalam dunia biologis maupun medis. Secara fundamental, tujuan para peneliti dan pekerja dalam bidang kultur sel adalah mempersiapkan sel untuk dikultur lebih lanjut dan juga untuk memeliharanya dalam sistem yang bebas kontaminasi walaupun dilakukan pasase (subkultur) berulang-ulang sesuai keperluan. Makin berkembangnya bidang bioteknologi menyebabkan kegiatan kultur sel menjadi ikut meluas. Berbagai metode baru telah dikembangkan sejalan dengan kebutuhan yang makin kompleks. Beberapa bidang ilmu yang menggunakan kultur sel antara lain biologi seluler, imunologi, farmakologi, biokimia, virologi, genetika, dan produksi berbagai bahan biologis.

## B. Teknik Kultur Jaringan Hewan

Teknik kultur sel dan kultur jaringan memungkinkan kita mempelajari perilaku sel secara *in vitro*. Kondisi lingkungan normal disimulasikan dalam suatu media tumbuh yang mengandung bahan kimia, faktor pertumbuhan, dan komponen serum. Sel-sel yang akan ditumbuhkan dapat dikoleksi dari jaringan baik secara enzimatis maupun mekanis, disuspensikan dan diisolasi dalam media kultur.

Pada kultur sel atau jaringan diusahakan sel dapat berproliferasi dan berdiferensiasi. Proses proliferasi menyangkut pertumbuhan sel sehingga pemahaman mengenai siklus pertumbuhan dan faktor yang berperan dalam proses pertumbuhan sangat diperlukan. Proses diferensiasi sel berhubungan dengan interaksi dan komunikasi sel, sehingga dibutuhkan pemahaman sifat-sifat sel.

Bagaimanakah teknik memperbanyak sel hewan secara *in vitro*? Syarat dasar yang dibutuhkan sel untuk dapat tumbuh dalam medium penumbuh. Berikut ini merupakan nutrisi-nutrisi yang terkandung dalam medium penumbuh antara lain:

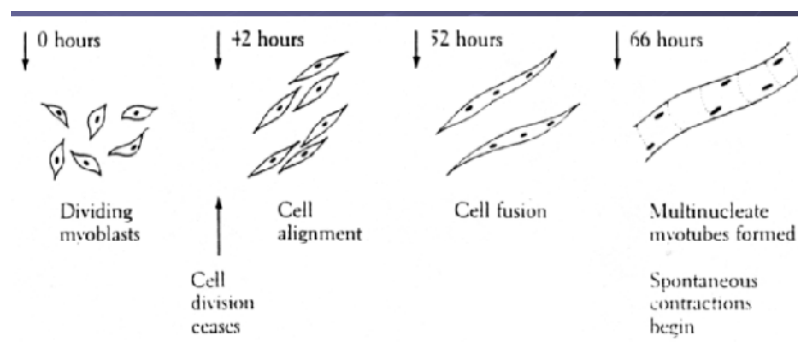
- ✓ MEM (*Minimum Essential Medium*) mengandung asam-asam amino esensial, vitamin dari kelompok vitamin B, dan garam-garam sebagai penentu osmolalitas yaitu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ .
- ✓ FBS (*Fetal Bovine Serum*) merupakan serum yang menjadi faktor yang mempengaruhi kondisi lingkungan sel dalam kultur sel. Serum mengandung hormon, protein, vitamin, glukosa, garam-garam mineral, faktor pertumbuhan dan faktor penghambat. Hormon dibutuhkan untuk pengambilan glukosa dan asam amino. Protein merupakan komponen besar dalam serum yang digunakan sebagai protein cadangan dan pentranspor bahan seperti mineral, asam lemak, hormon. Vitamin berperan membantu mempertahankan kegiatan-kegiatan normal suatu jaringan. Vitamin yang berperan langsung dalam proliferasi sel adalah vitamin B. Glukosa sangat diperlukan untuk proliferasi sel sebagai sumber energi. Mineral yang terkandung dalam serum antara lain Fe, Cu, Zn dan Se. Faktor pertumbuhan digunakan untuk memacu

proliferasi sel, sementara faktor penghambat (*inhibitor*) berupa pencemaran sebelum filtrasi dan akibat pemanasan.

- ✓ Antibiotik yaitu *penicillin-streptomycin* dan *fungiszone* yang berfungsi untuk membunuh bakteri dan mikroorganisme serta jamur yang tidak diinginkan dalam medium penumbuh.

Untuk dapat melakukan kultur jaringan hewan dipergunakan alat-alat sebagai berikut: Alat yang digunakan dalam penelitian kultur sel otot embrio ayam adalah *laminar air flow*, *magnetic stirrer*, autoclave, *binocular microscope*, *inverted microscope*, pH meter digital, pipet volumetrik (ukuran 1 ml, 5 ml, dan 10 ml) pipetor, hemasitometer, inkubator CO<sub>2</sub>, inkubator telur, *beakker glass*, gunting dan pinset, botol media, vortex, cawan petri, konikel, pembakar spritus, *counting chamber*, timbangan elektrik, *multiwells plate* 24 sumuran, saringan 0,22 µm (Strivex-GV, Milipore, Bedford, Massachusetts, USA).

Bahan yang digunakan dalam penelitian kultur sel otot embrio ayam adalah *Minimum Essential Medium* (MEM), *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Phosphate Buffered Saline* (PBS), *penicilin-streptomycin*, *fungizone* (Gibco, Life Tecnologies, USA), *Trypan Blue Stain* (TBS), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.



Gambar 1. Myogenesis: skeletal muscle formation

### C. Prinsip Dasar Kultur Jaringan Hewan

Penguasaan pengetahuan dasar merupakan syarat pokok dan keterampilan seseorang sangat menunjang kesuksesan di dalam memelihara kultur sel. Penanganan

kultur sel hendaknya dijalankan dalam kondisi benar-benar aseptik, karena sel/jaringan hewan tumbuh dan berkembang lebih lambat dari kontaminan umum seperti bakteri, *yeast* (jamur), dan *mycoplasma*. Beberapa prinsip dasar yang harus diperhatikan dan dipenuhi dalam rangka mendapatkan kultur jaringan/sel yang bersih dan tumbuh dengan baik antara lain: medium harus aseptik dan steril, medium harus menyediakan semua nutrisi yang diperlukan oleh sel, medium harus memelihara pH 7.0 – 7.4, dan preservasi sel.

✓ **Medium harus aseptik dan steril**

Kultur sel sebaiknya dilakukan di dalam ruangan tersendiri yang dilengkapi dengan *laminar air flow hoods*, *incubator*, dan mikroskop. Tempat tersebut sebaiknya juga berdekatan dengan ruang penyimpanan bahan untuk kultur jaringan, ruang persiapan, dan pencucian. Ruangan laboratorium perlu dibersihkan secara rutin. Meskipun ada petugas kebersihan laboratorium, seseorang yang bekerja dengan kultur sel juga harus mengetahui dan bertanggung-jawab atas kebersihan ruang kultur.

Semua pekerjaan manipulasi medium kultur dan sel dikerjakan di dalam ruang steril untuk mencegah kontaminasi oleh mikroorganisme yang ada di udara atau yang terbawa oleh kita. Hal tersebut dilakukan di dalam *laminar air flow cabinets* atau *hoods*, karena alat tersebut akan mengalirkan udara yang telah difilter ke tempat kerja. Filter yang digunakan adalah *high-efficiency particle filters* (HEPAs) yang dapat menyaring berbagai partikel dari udara dengan diameter > 0,03 µm. Dengan demikian hampir semua bakteri, spora jamur, dan sebagainya yang normal terdapat di udara dapat tersaring. Ada beberapa model/tipe cabinet yang tersedia saat ini dengan variasi ukuran dan dilengkapi *vertikal* atau *horizontal air flow*. Biasanya *cabinets* juga dilengkapi dengan lampu UV untuk membantu mempertahankan sterilitas ruangan. Lampu UV ini harus dimatikan pada saat *cabinets* sedang digunakan.

Kultur sel dan medium perlu disimpan dalam *container* steril. *Container* dapat berupa botol gelas atau plastik *disposable*. Botol gelas biasanya tidak digunakan untuk kultur sel tetapi untuk menyimpan medium, karena botol ini dapat digunakan lagi

setelah proses sterilisasi. Ada berbagai bentuk container plastik *disposable* yang dapat digunakan untuk kultur sel, bervariasi dari *mikroplate* dengan volume 200  $\mu$ L per sumuran sampai botol (*flask*) besar. Selain containers tersebut di atas, untuk kultur sel juga diperlukan *centrifuge tube* (*conical tube*) steril, yang digunakan dalam pencucian sel. Ukuran yang biasanya digunakan adalah 11 – 15 ml dan 50 ml.

Berbagai container kecil (*vial*) juga diperlukan untuk menyimpan sel di dalam Liquid Nitrogen. Berbagai cairan, alat gelas, filter dan sebagainya dapat disterilkan dengan pemanasan di dalam *autoclave* (minimal 20 menit pada tekanan 10 – 15 lb/in<sup>2</sup>, suhu 120°C). Cairan (selain medium kultur) yang akan disterilkan di simpan dalam botol gelas. Pada saat disterilkan tutup botol dilonggarkan dan dibungkus dengan aluminium foil. Pada saat mengangkat botol dari *autoclave*, tutup segera dikencangkan untuk menjaga sterilitas isinya. Benda-benda kecil yang akan disterilkan dapat dibungkus dengan aluminium foil, kassa, kertas payung atau kantong nylon sebelum di *autoclave*. Pipet kaca harus disumbat secara individual dengan kapas pada ujung belakangnya dan biasanya disterilkan dalam satu container metal. Berbagai alat gelas alat *dissecting* dapat juga disterilkan dengan cara pemanasan kering (90 menit pada suhu 160°C). Medium kultur tidak dapat disterilkan dengan cara pemanasan, tetapi dengan filter 0,22  $\mu$ m yang dapat memfilter berbagai mikroorganisme yang dapat mengkontaminasi kultur. Filter 0,45  $\mu$ m atau prefilter tidak dapat menyaring mikroorganisme, tetapi berguna untuk menghilangkan berbagai material sebelum filtrasi steril, dan pemakaian prefilter ini bermanfaat meningkatkan volume yang dapat difilter steril. Volume yang dapat difilter tergantung pada diameter filter, ukuran pori-pori, tekanan pada saat filtrasi dan viskositas cairan.

#### ✓ Temperatur

Kebanyakan sel yang berasal dari hewan perlu disimpan pada suhu 37°C agar dapat tumbuh secara optimal. Keadaan tersebut dapat dilakukan dengan menyimpannya dalam inkubator yang dapat menyediakan temperatur secara konstan dan terdistribusi secara merata di dalam inkubator. Untuk itu, kebanyakan inkubator dilengkapi dengan *thermostatically controlled water jacket* dan temperature control.



- ✓ Medium harus memelihara pH 7.0 – 7.4

Untuk produksi antibodi monoklonal sel hibridoma memerlukan bikarbonat sebagai ion buffer untuk membantu mempertahankan pH pada medium kultur. Agar sistem bufer ini dapat bekerja maka kultur dan mediumnya harus mendapatkan CO<sub>2</sub>. Dengan demikian diperlukan inkubator yang dapat mempertahankan kadar CO<sub>2</sub> 5 % di dalam udara CO<sub>2</sub> dapat disuplai dari gas CO<sub>2</sub> yang dihubungkan dengan CO<sub>2</sub> sensor ke dalam incubator. Ruangan di dalam incubator juga harus dijaga kelembabannya dengan menempatkan nampan yang diisi dengan aquadest steril supaya tidak terjadi kekeringan.

#### **D. Manfaat Kultur Jaringan Hewan**

##### **1. Pemanfaatan Kultur Sel dalam Penelitian**

Saat ini, kultur jaringan/sel hewan telah menjadi khasanah fundamental dalam bidang ilmu pengetahuan, seperti; biologi, kedokteran, farmasi, imunologi, dan bioteknologi. Setelah periode 1970-an banyak penemuan-penemuan dalam berbagai disiplin ilmu yang tidak terlepas dari pemanfaatan kultur jaringan seperti;

- ✓ Transport intramembran seperti:
  - 1) aktivitas dan perpindahan RNA dari inti ke sitoplasma dan translokasi hormon,
  - 2) pompa ion kalsium dan natrium,
  - 3) molekul karier untuk transport glukosa,
  - 4) reseptor hormon dan molekul lainnya.
- ✓ Aktivitas intraselular seperti:
  - 1) replikasi DNA,
  - 2) ekspresi gena,
  - 3) sintesis protein,
  - 4) isolasi beberapa sel mediator
  - 5) analisis kromosom untuk mengetahui kelainan genetik dari bayi dalam kandungan,
  - 6) mempelajari efek toksik dari komponen obat,

- 7) penentuan (diagnosis) adanya infeksi virus/ bakteri
  - 8) monitoring efek pencemaran lingkungan.
- ✓ Metabolisme intra-seluler seperti;
- 1) nutrisi,
  - 2) inversi dan adanya induksi transformasi dari virus atau agen kimiawi (obat-obatan),
  - 3) mekanisme regulasi steroidogenesis pada sel-sel steroidogenik,
  - 4) peran molekul *Insulin-like growth factor I* (IGF-I) terhadap pertumbuhan dan diferensiasi berbagai jenis sel.
  - 5) metabolisme energi, lemak, dan protein,
  - 6) reseptor kompleks dan fluktuasi mediator kimia dan metabolit dalam sel.
- ✓ Interaksi antar-sel, seperti:
- 1) sinyal antar-sel,
  - 2) populasi kinetik dan adhesi sel,
  - 3) peran berbagai hormon pada sel-sel ovarium secara langsung misalnya pengaruh estrogen terhadap ekspresi R-LH.

Oleh karena itu, teknologi kultur jaringan/sel saat ini menjadi kebutuhan pokok untuk menunjang penelitian-penelitian dibidang: tumor, virologi, dan imunologi, terlebih lagi setelah diperkenalkannya fusi sel somatik. Selain itu, kultur jaringan telah diaplikasikan dalam bidang industri (bioteknologi) dan kesehatan seperti; analisis kromosom untuk mengetahui kelainan genetik dari bayi dalam kandungan, mempelajari efek toksik dari komponen obat, penentuan (diagnosis).

## 2. Monitoring infeksi virus/ bakteri, dan monitoring efek pencemaran lingkungan.

Semakin berkembangnya dukungan dan penguasaan teknologi laboratorium sangat memungkinkan membuat kultur sel primer dari berbagai jenis sel hewan maupun manusia. Perkembangan kultur jaringan sebagai teknik baru dalam bidang biologi mempunyai kaitan erat dengan perkembangan bioteknologi, terlebih lagi

setelah diperkenalkannya fusi sel somatik. Kemajuan yang sangat menggembirakan dalam bioteknologi adalah penerapan rekayasa genetika dengan menyisipkan gen-gen tertentu yang dikehendaki ke dalam sel yang telah kultur dengan tujuan untuk memproduksi insulin dan/atau beberapa hormon pertumbuhan dalam skala besar.

Selain itu, kultur jaringan telah diaplikasikan dalam bidang industri (bioteknologi) untuk memproduksi vaksin, protein, dan antibodi monoklonal. Saat ini, antibodi monoklonal (monoklonal antibodi = MAB) menjadi semakin populer karena penggunaan yang sangat meluas baik untuk penelitian maupun uji klinis termasuk diagnosis dan bahkan upaya mencapai target spesifik untuk pengobatan.

### **LATIHAN SOAL**

1. Kultur jaringan hewan diaplikasikan dari teori totipotensi sel bahwa setiap sel dapat membawa informasi genetik yang lengkap. Jelaskan bagaimana proses dan syarat dalam melaksanakan kultur jaringan hewan meliputi:
  - a. Komposisi media
  - b. Pengaturan temperatur dan suhu
  - c. Pengaturan ph.
2. Jelaskan manfaat kultur jaringan hewan pada manusia khususnya dalam bidang kesehatan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Hussain, A., I.A. Qarshi, H. Nazir and I. Ullah. 2010. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. <http://dx.doi.org/10.5772/50568>.: 1-28.
- Mariska, I. dan Husni, A. 2006 Perbaikan Sifat Genotipe Melalui Fusi Protoplas Pada Tanaman Lada, Nilam, Dan Terung. *Jurnal Litbang Pertanian*, 25(2): 55-60.
- Mantell SH, and H Smith. 1983. Culturel Factor That Influence Secondary Metabolite Accumulation in Plant Cell and Tissue. In: *Plant Biotechnology*. Mantell SH and H Smith (Eds). 75-108. Cambrige University Press. New York.
- Mineo, L. 1990. Plant tissue culture techniques. Pages 151-174, in *Tested studies for laboratory teaching*. Volume 11. (C. A. Goldman, Editor). Proceedings of the Eleventh Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 195 pages.
- Puspitasari, R.L., T. Caroline, Sardjono, B. Setiawan, F.Sandra. 2008. Kultur Embrionic Stem Cell menjadi Sel Neuron dengan Medium Bebas Serum. *CDK* 165.35 (6): 342-344.
- Riyadi, I. 2006. Isolasi Protoplas Tanaman Kacang Panjang secara Enzimatis. *Buletin Plasma Nutfah* 12(2): 62-68.
- Seswita, D. 2010. Penggunaan Air Kelapa Sebagai Zat Pengatur Tumbuh Pada Multiplikasi Tunas Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) secara *In Vitro*. *Jurnal Littri* 16(4):135-140.
- Silalahi, M. 2010. Pengaruh Modifikasi Media Murashige-Skoog (MS) dan Zat Pengatur Tumbuh BAP terhadap Pertumbuhan Kalus *Centella asiatica* L.(Urban.) Pengaruh Modifikasi Media Murashige-Skoog (MS) dan Zat Pengatur Tumbuh BAP terhadap Pertumbuhan Kalus *Centella asiatica* L.(Urban.). *Prolife* 2(1):11-17.
- Silalahi, M., 2010. Elisitasi Peningkatan Produksi Ajmalisin oleh Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Berita Biologi* 10(3):305-312.
- Singh, H.P., S. U.R. Selvarajan, and J.L. Karihaloo. 2011. *Micropropagation For Production of Quality Banana Planting Material In Asia-Pacific*. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB) Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions (APAARI) NASC Complex, Dev Prakash Shastri Marg, Pusa Campus New Delhi, India

- Yelnititis dan T.E. Komar. 2010. *Technical Report Upaya Induksi Kalus Embriogenik Dari Potongan Daun Ramin*. Pusat Penelitian Dan Pengembangan Hutan Dan Konservasi Alam Kementerian Kehutanan Bogor: 1-28.
- Zakiah, Z. E. Marwani, dan A. H. Siregar. 2006. Peningkatan Produksi Azadirachtin dalam Kultur Suspensi Sel *Azadirachta indica* A.Juss melalui Penambahan Skualen. *Jurnal Matematika dan Sains* 8 (4):141-146.